

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Química Física I**



**PAPEL DEL AGUA EN LA FORMACIÓN DE**  
**AGREGADOS SUPRAMOLECULARES BAJO PRESIÓN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Eduardo Hidalgo Baltasar**

Bajo la dirección de los doctores

Bérengère Guignon  
Mercedes Taravillo Corralo

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Química-Física I**

**PAPEL DEL AGUA EN LA FORMACIÓN  
DE AGREGADOS SUPRAMOLECULARES  
BAJO PRESIÓN**



Memoria para optar al Grado de Doctor  
presentada por

**Eduardo Hidalgo Baltasar**

Madrid, Mayo de 2013



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA I**

**“PAPEL DEL AGUA BAJO PRESIÓN EN LA FORMACIÓN DE AGREGADOS SUPRAMOLECULARES”**

**DIRIGIDA POR:**

**Dra. Bérengère Guignon**

**Investigadora en el Departamento de Procesos.**

**Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. ICTAN-CSIC**

**Dra. Mercedes Taravillo Corralo**

**Profesora Titular del Departamento de Química Física I.**

**Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR**

**Eduardo Hidalgo Baltasar**

**PROGRAMA DE DOCTORADO QUÍMICA FÍSICA APLICADA**

**Madrid, Mayo de 2013**



# ***AGRADECIMIENTOS***

---

Dice el refranero español: “Es de bien nacidos ser agradecidos”, y no es hasta el momento de escribir estos agradecimientos hasta que no me he dado cuenta de toda la gente a la que debo dar las gracias, de una forma u otra, por haberme ayudado, apoyado, aconsejado y dado ánimos para poder acabar esta tesis. A todos os doy las gracias de corazón, si no hubiese sido por vosotros hubiese tirado la toalla hace meses. Gracias por estar ahí cuando las cosas parecían que no podían ir peor, pero sí, podían ir peor. Me gustaría dar las gracias especialmente a las siguientes personas e instituciones que han hecho posible que finalmente la tesis saliera adelante.

En primer lugar al extinguido Ministerio de Ciencia e Innovación por concederme una beca FPI en 2008 para poder realizar la tesis durante 4 años, y al INEM por darme la financiación económica necesaria para poder continuarla unos meses más, aunque no los suficientes, todo sea dicho.

A Valen, por darme la oportunidad nada más acabar la carrera de incorporarme al grupo de investigación y poder aplicar un poquito de todo lo que aprendemos durante la licenciatura. Gracias por tu apoyo, por tus aportaciones, por tratarme tan bien y hacerme sentir tan a gusto estos años.

A mis dos directoras Merce y Bérengère. Gracias por enseñarme todo lo que he aprendido estos años, vuestra disposición, paciencia y ayuda.

A Jose, Paco y Bea del CAI de espectroscopía por su dedicación con las medidas de dispersión de luz.

Al departamento de Química Física I de la Facultad de Química de la UCM y al departamento de Procesos del ICTAN, en especial a Pedro por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su atención e interés en ver los avances de los experimentos. Y al resto del grupo, Mario, Cristina, Kharla, Ana y Laura, y a mis compañeros de laboratorio Emmanuelle y Quique por su ayuda y los buenos momentos que pasamos.

A Tigran, por darme la oportunidad de realizar mi estancia en su laboratorio en Toronto y hacerme sentir como en casa desde el primer día. A mis compañeros y amigos Yuen e Ikbae por los buenos ratos en el laboratorio y fuera de él, por las risas en las clases de inglés y español y por ayudarme a integrarme en la vida de la ciudad. A Sam, por ayudarme con la “bureaucrazy” y el papeleo. Y al resto de compañeros de la facultad, Yang, Bitá...

A todos los “torontonteños” que conocí. Gracias por todas las risas, viajes, fiestas, partidos de NBA, hockey, karaokes... que compartimos, y que nos quedan! Obrigado Janayna! ขอบคุณ Pom! dank Julia! Thanks Ko! Merci Fabien! Gracias Felipe, Álvaro, Tatiana, Blas, Paula, Juan, Magda, Rafa, Elena, Iván, Kybel, Jose, Alma y Sergio. Fuisteis mi familia y amigos durante los 3 meses y los seguiréis siendo, “family ein”.

A mis compañeros y amigos de grupo, porque así daba gusto ir a trabajar. Gracias Merche, Ángel, David, Elena, Víctor, Nubia, Álvaro, Miriam, Óscar y Javi. Gracias por vuestra ayuda, interés, apoyo y ánimo.

A Marta, Noe y Vane, porque no puedo entender todos estos años sin vosotras. Gracias por el apoyo durante la carrera cuando las cosas no paraban de ir cuesta arriba. Gracias por los días de biblioteca, las tardes de césped, las noches de risas, las fiestas hasta las mil, los chill out.... Gracias por escucharme, por aconsejarme y por animarme a no dejar la tesis a pesar de todas las dificultades. Gracias por preocuparos por mí estos meses tan duros. Sin vosotras no lo hubiese conseguido, sin duda. No lo pudo describir mejor Noe: “sois el eje de esta gran historia”.

A los nazarenos, orgánicos y los del ICMM por los buenos ratos que pasamos, por las noches que salimos a tomar algo y nos dan las 6, por las furruscas, casas rurales y tesis gitanas que nos esperan. Gracias Agus, Sonia, André, Luis, Andrea, Antonio, Javi, María, Alberto, Paula, Almu, Constanza, Anto y Richard.

A todos mis amigos que siempre están ahí, sois los mejores amigos que se puede tener. Gracias Gema, Rodri, Merche, Jose, Cristina, Alberto, Miguel, Julia, Raquel, Cristina, Ángel, María, Carlos, Elena...

A mi familia, en especial a mis padres y mi hermano, porque simplemente os debo todo.











# ÍNDICE

---

<b>1. Introducción</b>	1
1.1 Referencias	6
<b>2. Objetivos y estrategia</b>	8
2.1 Referencias	12
<b>3. Técnicas Experimentales</b>	13
3.1 Introducción	13
3.2 Dispositivos	14
3.2.1 Medida de la densidad y la velocidad del sonido a presión atmosférica	14
3.2.2 Dispositivo experimental para la medida de propiedades a alta presión	15
3.2.2.1 Equipo de alta presión	16
3.2.2.2 Sistema de medida de propiedades volumétricas	19
3.2.2.3 Sistema de medida de propiedades acústicas	21
3.2.2.4 Dispositivos anexos	24
3.3 Procedimientos experimentales	26
3.3.1 Verificación y calibración de los equipos	26
3.3.1.3 Calibración del equipo de medida de cambio de volumen	26
3.3.1.2 Calibración de la célula de medida de propiedades acústicas	30
3.3.2 Procedimiento de las medidas	32
3.3.2.1 Medidas de velocidad del sonido	32
3.3.2.2 Medidas de cambio de volumen	35
3.3.3 Tratamiento de los datos experimentales	36
3.3.3.1 Medidas de velocidad del sonido	36

3.3.3.2 Medidas de cambio de volumen .....	40
3.4 Referencias.....	42
<b>4. Estudio de la agregación del agua.....</b>	<b>45</b>
4.1 Introducción .....	46
4.1.1 La molécula de agua .....	46
4.1.2 Estructura del agua líquida .....	48
4.1.3 Anomalías en el comportamiento del agua.....	53
4.1.4 Estructura y propiedades del agua líquida a alta presión: Estudios previos .	57
4.1.5 Velocidad del sonido bajo presión.....	66
4.2 Procedimiento experimental.....	70
4.2.1 Incertidumbre de las medidas .....	73
4.3 Resultados .....	76
4.3.1 Velocidad del sonido.....	76
4.3.2 Comparación de los resultados obtenidos con la bibliografía .....	78
4.3.3 Aplicaciones de las medidas de velocidad del sonido .....	81
4.3.4 Efecto cinético en la transición de fase agua – hielo III y agua – hielo V .....	95
4.4 Resumen y conclusiones .....	97
4.5 Referencias.....	98
<b>5. Estudio de la agregación del dodecanoato de sodio .....</b>	<b>103</b>
5.1 Introducción .....	103
5.1.1 Formación de agregados .....	104
5.1.2 Influencia de distintos factores en la formación de micelas .....	107
5.1.3 Sistema de estudio: dodecanoato de sodio .....	113
5.2 Metodología específica .....	114
5.3 Resultados .....	116
5.3.1 Determinación de la concentración micelar crítica a 298.15 K y presión atmosférica: Validación de la metodología .....	117
5.3.2 Estudio del efecto de la temperatura sobre la formación de micelas a presión atmosférica .....	120
5.3.3 Estudio del efecto de la presión a 298.15 K sobre la CMC .....	127
5.4 Resumen y conclusiones .....	137
5.5 Referencias.....	137
<b>6. Estudio de la agregación de caseínas .....</b>	<b>139</b>
6.1 Introducción .....	139
6.1.1 La agregación de proteínas.....	140
6.1.1.1 Aspectos generales.....	140
6.1.1.2 Factores que inducen la agregación de proteínas.....	143
6.1.1.3 Efectos de la presión sobre la agregación de proteínas.....	145
6.1.1.4 Importancia del fenómeno de agregación de proteínas en ciencias .	148
6.1.2 Sistema de estudio: las caseínas.....	149
6.1.2.1 Características principales .....	149

6.1.2.2 Los agregados de caseína .....	151
6.1.2.3 Los agregados de caseínas en disoluciones de caseinato .....	155
6.1.2.4 Usos de las caseínas en la industria .....	156
6.1.2.5 Influencia del proceso sobre las características de las caseínas .....	158
6.1.3 Caseínas a alta presión: pasado, presente y futuro .....	159
6.1.3.1 Antecedentes en el caso de la leche .....	159
6.1.3.2 Antecedentes en el caso del caseinato .....	163
6.1.3.3 Investigaciones actuales .....	163
6.1.3.4 Oportunidades de aplicaciones del tratamiento de caseínas a alta presión para la industria láctea .....	165
6.2 Metodología específica .....	167
6.2.1 Estudio de la composición química de la muestra de caseinato de sodio ....	167
6.2.2 Preparación de las disoluciones .....	168
6.2.3 Condiciones de la experimentación .....	168
6.3 Resultados.....	169
6.3.1 Estudio del caseinato de sodio a presión atmosférica .....	169
6.3.1.1 Medidas de velocidad del sonido.....	169
6.3.2 Estudio de las caseínas a alta presión .....	170
6.3.2.1 Medidas de velocidad del sonido.....	170
6.3.2.2 Ajustes de la derivada del tiempo de vuelo frente a la presión.....	172
6.4 Resumen y conclusiones .....	174
6.5 Referencias.....	175
<b>7. Estudio de la interacción agua - agregado mediante propiedades volumétricas aparentes .....</b>	<b>181</b>
7.1 Introducción .....	181
7.1.1 Las propiedades aparentes.....	182
7.1.1.1 Volumen aparente.....	182
7.1.1.2 Compresibilidad adiabática aparente .....	183
7.1.2 Aplicaciones de las propiedades aparentes .....	184
7.1.2.1 Caracterización de las condiciones de agregación de compuestos anfífilos de uso detergente, farmacéutico, textil o cosmético	184
7.1.2.2 Mecanismos de plegamiento y de desnaturalización de proteínas en medio acuoso .....	185
7.1.2.3 Índice de sabor .....	186
7.1.3 Efecto de factores sobre las propiedades aparentes .....	186
7.1.3.1 Efecto de la temperatura sobre las propiedades aparentes en disoluciones acuosas de surfactantes y de proteínas .....	186
7.1.3.2 Efecto de la presión sobre las propiedades aparentes en disoluciones acuosas de surfactantes y de proteínas .....	188
7.2 Metodología específica .....	190
7.2.1 Preparación de las muestras .....	190
7.2.2 Experimentos realizados .....	190

7.3 Resultados .....	190
7.3.1 Resultados a presión atmosférica: comparación con estudios previos .....	191
7.3.1.1 Efecto de la concentración sobre las propiedades aparentes .....	195
7.3.1.2 Efecto de la temperatura sobre las propiedades aparentes .....	203
7.3.2 Resultados a alta presión.....	210
7.3.2.1 Determinación del volumen específico aparente a alta presión .....	211
7.3.2.2 Determinación de la compresibilidad adiabática aparente .....	214
7.4 Resumen y conclusiones .....	217
7.5 Referencias.....	217
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>219</b>
 <i><b>Apéndice I: Datos de velocidad del sonido del agua .....</b></i>	 <i><b>223</b></i>
<i><b>Apéndice II: Datos de densidad y velocidad del sonido del dodecanoato de sodio .....</b></i>	 <i><b>239</b></i>
<i><b>Apéndice III: Aplicación de las medidas de densidad y velocidad del sonido del dodecanoato de sodio: determinación de la compresibilidad adiabática .</b></i>	<i><b>245</b></i>
AIII.I Introducción .....	245
AIII.II Medidas realizadas .....	245
AIII.III Resultados .....	246
AIII.III.I Medidas de densidad .....	246
AIII.III.II Empleo de las medidas de densidad y velocidad del sonido .....	249
AIII.IV Referencias .....	255
<i><b>Apéndice IV: Aplicación de las medidas de densidad y velocidad del sonido del caseinato de sodio: determinación de la compresibilidad adiabática .....</b></i>	<i><b>257</b></i>
AIV.I Introducción .....	257
AIV.II Medidas realizadas.....	258
AIV.III Resultados .....	258
AIV.III.I Medidas de densidad .....	258
AIV.III.II Empleo de las medidas de densidad y velocidad del sonido .....	260
AIII.IV Referencias .....	261
<i><b>Apéndice V: Dispersión de Luz Dinámica: Fundamentos y Aplicación al caseinato de sodio .....</b></i>	<i><b>263</b></i>
AV.I Fundamentos de la dispersión de luz dinámica .....	263
AV.II Medidas de dispersión de luz en caseinato de sodio .....	265
AV.II.I Medidas en una muestra sin tratar a alta presión .....	265
AV.II.II Medidas tras un tratamiento a alta presión .....	267
AV.III Referencias.....	267
 <i><b>Abstract .....</b></i>	 <i><b>269</b></i>

# ***CAPÍTULO 1***

## ***INTRODUCCIÓN***

---

Desde siempre, la conservación de los alimentos ha representado un reto esencial para la supervivencia de las sociedades. Tras secar, salar o congelar los alimentos para almacenarlos durante tiempos prolongados en la prehistoria, se han ido desarrollando, a lo largo de los siglos, métodos de conservación más elaborados. La sofisticación de estos métodos responde a la necesidad de incrementar la calidad de la producción de los alimentos. En efecto, si inicialmente la meta principal era conservar la mayor cantidad de alimentos posible, hoy en día, también se trata de conseguir producirlos con los más altos estándares de calidad. Así, en los países desarrollados, los consumidores exigen alimentos sanos y seguros, buscando que tengan buen aspecto, sabor, color y textura, y esperando también que sus propiedades nutricionales sean las óptimas. Además, en el contexto de la globalización mundial de los mercados, entran en juego otros aspectos en la conservación de alimentos como son la sostenibilidad medioambiental y energética de los procesos tecnológicos implicados, contribuyendo todo ello también a la calidad total de los alimentos.

Tradicionalmente se han utilizado métodos térmicos para la conservación de los alimentos.<sup>1</sup> Éstos se acompañan, en mayor o menor medida, de una modificación de las características organolépticas del alimento y una pérdida de calidad nutricional.



Además, los equipos consumen una gran cantidad de energía para alcanzar rápidamente las temperaturas de tratamiento, sea para enfriar o calentar el producto. De ahí que se haya invertido un importante esfuerzo de investigación para desarrollar nuevas tecnologías para la conservación de alimentos encaminadas a una máxima calidad. Entre las más novedosas tecnologías se encuentran los procesos a alta presión hidrostática.<sup>2</sup> Dichos tratamientos se han planteado como alternativa o complemento a los tratamientos térmicos convencionales de alimentos (pasteurización, cocción, esterilización, etc.). En aplicaciones comerciales los valores típicos de presión y temperatura son hasta 800 MPa<sup>i</sup> y entre 5 y 40 °C, respectivamente.<sup>3</sup>

El procesado de alimentos mediante alta presión, a veces llamado “pascalización”, consiste en someter a los mismos – en general, previamente envasados en recipientes herméticos, flexibles, y resistentes al agua – a un alto nivel de presión hidrostática, entre 200 y 600 MPa, durante unos minutos. De acuerdo con el principio de Pascal en el que se basa, una alta presión hidrostática ejercida sobre un fluido (habitualmente, el agua) que rodea el alimento, se transmite de forma rápida y uniforme a todo el volumen del alimento independientemente de su forma o tamaño. Gracias a ello, es posible procesar todo tipo de alimentos: productos cárnicos, pescados y derivados, moluscos y crustáceos, frutas y verduras, zumos, bebidas lácteas, etc. El procesado es sencillo: los productos a tratar se introducen en el interior de la vasija del equipo de alta presión, ésta se cierra, se realiza la compresión en cuestión de uno o dos minutos, se mantiene el producto bajo presión el tiempo necesario para la inactivación de los microorganismos, se libera la presión y se descarga el lote de producto. La vasija, de geometría cilíndrica, cuenta con paredes de acero inoxidable de gran espesor (el espesor de la pared es del mismo orden de magnitud que el diámetro interior de la vasija) de manera que pueda soportar dicha alta presión. Mientras el alimento no contenga mucho aire y sus constituyentes tengan compresibilidades similares, su forma y su integridad permanecen a la salida del equipo debido a que la presión se distribuye de forma similar en todo el producto. Se conoce que la presurización en frío o a temperatura ambiente por encima de 200 MPa inactiva ciertos microorganismos como bacterias, levaduras y hongos, presentes en los productos alimentarios, pero respetando a la vez sus propiedades organolépticas y nutricionales.<sup>4,5</sup> Así, la frescura original del alimento se mantiene en gran medida durante todo su periodo de vida útil.<sup>6</sup> Por otro lado, otra ventaja de los equipos de

---

<sup>i</sup> En este campo las unidades comúnmente usadas para indicar la presión son MPa. 1 MPa = 10 bar ≈ 10 atm. En esta tesis se ha trabajado con sistemas acuosos y con el equipo utilizado la presión máxima alcanzada ha sido de 700 MPa, es decir, unas 7000 atmósferas.

altas presiones es que tan sólo requieren electricidad y agua. El agua usada para transmitir la presión se recicla y, excepto en el momento de la compresión, el requerimiento en energía es menor que el de un equipo de tratamiento térmico. Es por ello que, la tecnología de altas presiones hidrostáticas se considera un proceso mínimo, respetuoso con el medio ambiente y económico. En contrapartida, hay que mencionar que un equipo de alta presión es más costoso que un equipo de tratamiento térmico y su rendimiento más limitado. En general, ha sido el beneficio ganado por tratar un determinado producto a alta presión (valor añadido) lo que ha determinado finalmente si la inversión es rentable y, por tanto, si estos procesos son adecuados para conservar alimentos.

La protección ofrecida por el tratamiento a altas presiones a las características organolépticas y nutricionales frente al tratamiento térmico se debe al desplazamiento (y eventual ruptura) del equilibrio del sistema de acuerdo con el principio de Le Châtelier. Las reacciones que implican una disminución de volumen se ven favorecidas bajo presión y viceversa. La ruptura de un enlace covalente, en general, conllevaría un aumento de volumen. En consecuencia, los enlaces covalentes presentes en muchas moléculas responsables de las características organolépticas y nutricionales del producto se mantienen bajo una presión moderada.<sup>7</sup> En el caso de un tratamiento térmico, suele suceder lo contrario: los enlaces se rompen y se pueden desencadenar una serie de reacciones que modifican el sabor, color y olor del alimento; pero sobretodo, se deterioran nutrientes de interés para la salud como las vitaminas. En el caso de los enlaces más débiles, presentes, por ejemplo, en las proteínas y algunos carbohidratos, éstos suelen cambiar bajo presión y dar lugar a cambios en la organización estructural de los componentes del alimento.<sup>8</sup> De manera que se ha descrito principalmente la formación de geles pero también cambios en el estado de agregación de las moléculas.<sup>9,10</sup>

Uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial y con gran cantidad de propiedades beneficiosas para el organismo es la leche. La leche es una mezcla compleja que incluye agua, proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales. Su vida útil es muy corta y durante siglos se ha consumido poco tiempo después de su obtención del animal, o bien fermentándola para fabricar otros productos como el queso. En la actualidad, se utiliza tras un tratamiento térmico a pesar de que, como se mencionó antes, éste altera sus características organolépticas y nutricionales. Por ello, la leche fue uno de los primeros alimentos en ser tratado a alta presión en busca de una alternativa al tratamiento térmico tradicional. El proceso se mostró efectivo a nivel microbiológico pero desveló otro efecto de la presión en la leche: se volvió

ligeramente traslucida.<sup>11</sup> Ese cambio de aspecto se relacionó con el estado de agregación de las proteínas mayoritarias de la leche: las caseínas.<sup>12</sup> Aumentando la concentración en proteínas, se llegó a inducir diferentes geles cuya textura se diferenciaba claramente de la de los geles obtenidos por calor o acidificación o reacción enzimática a presión atmosférica. Investigaciones en otros sistemas proteicos (por ejemplo el huevo o la soja) llevaron a observaciones similares sobre los efectos de la presión.<sup>13</sup> Esos resultados abren la oportunidad de aplicar la presión ya no sólo para higienizar los alimentos, sino también para diseñar alimentos con una textura a medida.

Si atendemos únicamente a los aspectos que son ya conocidos en el comportamiento de las proteínas, se ha descrito que dependiendo de las condiciones de presión, temperatura, pH, etc. la proteína se puede desnaturalizar, agregar, disociar, formar un gel o precipitar. En este sentido, se ha definido un diagrama de fase presión-temperatura con forma elíptica que delimita la región de estabilidad de una proteína en estado nativo de la región de desnaturalización.<sup>14</sup> Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios de los efectos de la presión sobre las proteínas en medio acuoso, los mecanismos que conducen a estos resultados no se encuentran del todo dilucidados. Esto se debe a que la mayoría de los análisis se llevan a cabo sobre las muestras después del tratamiento y no directamente *in situ* bajo presión. El motivo principal a proceder de esta manera es, probablemente, la falta de equipamientos adecuados para los análisis *in situ* en el intervalo de presiones utilizadas en la industria alimentaria. Si las técnicas de espectroscopía en celdas de yunque son conocidas en el ámbito de la caracterización de materiales a alta presión, lo son mucho menos en el de las ciencias y tecnología de los alimentos. Además, presentan el inconveniente de que la presión no se ajusta a priori y no permiten un ajuste fino. Esto es, la presión se deduce a posteriori y alcanza rápidamente niveles del orden del gigapascal, es decir, fuera del rango de interés para el tratamiento industrial de alimentos. Tampoco es fácil el control ni el seguimiento de la temperatura, un parámetro crucial en el estudio de los alimentos. Se precisa entonces de equipos específicamente adaptados para ese fin, equipos por los que no existe apenas oferta comercial sino más bien desarrollos de prototipos propios o en colaboración. Por ello, la comprensión de los complejos fenómenos que transcurren bajo presión en los alimentos es limitada y sigue siendo insuficiente para poder elaborar modelos predictivos o plantear una teoría unificada. Aún no es posible hacer un uso razonado y preciso de la presión en combinación con la formulación para alcanzar el estado deseado de las proteínas y la textura que se le

asocia. Se requiere recabar más información, completando y enriqueciendo los conocimientos actuales sobre el tema.

En esta tesis, abordamos la cuestión de los cambios en el estado de agregación de las proteínas con la presión. En contraste con las investigaciones previas relacionadas con este tema, proponemos dar el protagonismo al agua. El agua es una molécula sencilla formada simplemente por tres átomos pero que es considerada fundamental en algo tan complejo como el origen de la vida. No deja de sorprender cómo tan sólo dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno pueden presentar características y propiedades tan asombrosas, en ocasiones difícilmente explicables, anómalas,<sup>15</sup> pero que hacen que sea una molécula absolutamente esencial para gran cantidad de mecanismos biológicos. En particular, se señala al agua como parte responsable del comportamiento de las proteínas en disolución a presión atmosférica (plegamiento tridimensional adoptado, desnaturalización, propiedades anticongelantes, etc.). Al tener un carácter anfifílico, las proteínas interactúan con el agua dando lugar a efectos hidrofóbicos e hidrofílicos. Según el balance entre estos efectos, las proteínas pueden o no formar agregados. Si la presión modifica las propiedades del agua, interfiere en el balance de estos efectos hidrofóbicos e hidrofílicos. Nuestra hipótesis de partida es, entonces, que los cambios en el estado de agregación de sistemas supramoleculares (como las proteínas) a alta presión están ligados a la influencia de la presión en el agua.

Vemos cómo el agua tiene un gran protagonismo en numerosos procesos fisicoquímicos o biológicos, entre otros. En el caso de esta tesis, otro de los aspectos fundamentales que nos hemos propuesto ha sido conjugar el efecto de la presión con el estudio del agua, puesto que, como hemos visto, resulta de gran interés para la comunidad científica y constituye todo un reto con resultados prometedores.

El estudio del agua bajo presión es un tema recurrente durante años. Ya a principios del siglo pasado, Bridgman dedicó grandes esfuerzos al estudio de las propiedades termodinámicas del agua a alta presión.<sup>16</sup> Uno de los aspectos que resulta más interesante sobre el efecto de la presión en el agua es el descubrimiento de dos fases diferentes para ésta en su estado líquido, el agua de baja densidad (low density water, LDW) y el agua de alta densidad (high density water, HDW). Apenas hay recogidos en la bibliografía unos cuantos estudios sobre este comportamiento.<sup>17,18,19</sup> Una de las motivaciones de esta tesis ha sido el estudio de manera muy precisa de dicha transición mediante medidas de velocidad del sonido. Además, en la bibliografía no existen datos precisos para la velocidad del sonido del agua a ciertas temperaturas y presiones, por lo que la motivación es doble: por un lado obtener con alta precisión

valores de la velocidad del sonido en función de la presión y en un amplio intervalo de temperaturas, y utilizar estas medidas para aportar luz a la discrepancia que existe en las condiciones a las que se produce la transición entre el LDW y el HDW. Sin duda las medidas de velocidad del sonido son capaces de detectar esta transición dada su alta sensibilidad, a pesar de que los cambios son muy sutiles y no ocurren a un valor de temperatura y presión concreto, sino más bien en un intervalo.

## 1.1 Referencias

- <sup>1</sup> López Alonso R., Torres Zapata T., Antolín Giraldo G.; *Alimentación, equipos y tecnología*, **2004**, 187, 45-54.
- <sup>2</sup> Guignon B. Capítulo 18, págs. 441-457, en Menéndez J. M., Aguado F., Valiente R., Recio J. M., *"Materia a Alta Presión: Fundamentos y Aplicaciones"*, Servicio de publicaciones de la Universidad de Oviedo y Universidad de Cantabria, Oviedo, **2011**.
- <sup>3</sup> Heinz V., Buckow R.; *J. Consumer Protection and Food Safety*, **2010**, 5, 73-81.
- <sup>4</sup> Smelt J. P. P. M.; *Trends in Food Science & Technology*, **1998**, 152-158.
- <sup>5</sup> Rendueles E., Omer M. K., Alvseike O., Alonso-Calleja C., Capita R., Prieto M.; *Food Science Technology*, 2011, 44, 1251-1260.
- <sup>6</sup> Barba F. J., Esteve M. J., Frigola A.; *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012, 11, 307-322.
- <sup>7</sup> Riad Manaa M. Editor; *"Chemistry at Extreme Conditions"*, Elsevier, Amsterdam **2005**.
- <sup>8</sup> Boonyaratanakornkit B. B., Park C. B., Clark D. S.; *Biochem. and Biophys.*, 2002, 1595, 235-249.
- <sup>9</sup> Mozhaev V. V., Heremans K., Franks J., Masson P., Balny C.; *Proteins*, **1996**, 24, 81-91.
- <sup>10</sup> Devi A. F., Buckow R., Hermar Y., Kasapis S.; *J. Food Eng.*, 2013, 114, 106-122.
- <sup>11</sup> Huppertz T., Smiddy M. A., Upadhyay V. K., Kelly A. L.; *Int. J. Dairy Tech.*, **2006**, 59, 58-66.
- <sup>12</sup> Knudsen J. C., Skibsted L. H.; *Food Chemistry*, **2010**, 119, 202-208.

- 
- <sup>13</sup> Volk S. P.; *"Impact of high-pressure processing on soy and egg proteins"*. Graduate These and Dissertations Paper 11057. **2009**.
- <sup>14</sup> Winter R.; Capítulo 2, págs. 29-82 De la Ref. [7].
- <sup>15</sup> Ludwig R.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 1808-1827.
- <sup>16</sup> Bridgman P. W.; *Proc. Amr. Acad. Arts. Sci.*, **1911**, 47, 441-558.
- <sup>17</sup> Saitta A. M., Datchi F.; *Phys. Rev. E.*, **2003**, 67, 020201(R).
- <sup>18</sup> Kawamoto T., Ochiai S., Kagi H.; *J. Chem. Phys.*, **2004**, 120, 5867.
- <sup>19</sup> Li F., Cui Q., He Z., Cui T., Zhang J., Zhou Q., Zou G.; *J. Chem. Phys.*, **2005**, 123, 174511.



## ***CAPÍTULO 2***

### ***OBJETIVOS Y ESTRATEGIA***

---

Como se ha indicado con el título de esta tesis, el objetivo de la misma es estudiar qué papel juega el agua en los fenómenos de agregación supramolecular de determinados sistemas en condiciones de alta presión. Para alcanzar este objetivo principal es necesario alcanzar varios sub-objetivos por medio de la siguiente estrategia:

1. Emplear técnicas de caracterización *in situ* de dichos sistemas en las condiciones de temperatura y presión alcanzables en equipos industriales utilizados en el procesamiento de alimentos. Para ello, se dispone de un equipo de alta presión a escala de laboratorio (46 mL de capacidad) con el que se alcanzan presiones de hasta 700 MPa en un intervalo de temperaturas de 253 K hasta 373 K. Permite, mediante distintos cabezales intercambiables, determinar propiedades físicas como la velocidad del sonido o la densidad en líquidos.
2. Adoptar un análisis ascendente (“bottom-up”) del problema, aumentando progresivamente el grado de complejidad del sistema bajo estudio. Se empezará con el agua, se introducirá un sistema anfifílico modelo, el



dodecanoato de sodio, para pasar finalmente a un sistema de proteínas complejo, las caseínas.

3. Hacer un análisis de los resultados desde la perspectiva del agua tendiendo a una mirada transversal sobre el estudio.

Teniendo en cuenta esta estrategia, los sub-objetivos concretos y el camino seguido para su consecución se describen a continuación.

- **Sub-objetivo 1:** Caracterizar el efecto de la presión sobre la organización estructural del agua líquida mediante medidas de velocidad del sonido.

El conjunto de datos de velocidad del sonido en el agua en condiciones de alta presión en la bibliografía es incompleto para algunas temperaturas. Además, la incertidumbre de los valores existentes es a veces mayor de lo deseable. Por lo tanto, se ha medido dicha magnitud en el intervalo de temperaturas desde 253.15 K hasta 348.15 K en las condiciones de presión en las que el agua se encuentra en fase líquida. Utilizando la ecuación de estado del agua de la *International Association of Properties of Water and Steam* (IAPWS-95 formulation),<sup>1</sup> se desarrollará la metodología de determinación de la velocidad del sonido a alta presión que será aplicada en el resto de la tesis. Tras comprobar la calidad de los datos (baja incertidumbre), se pretende utilizar estos resultados para resolver cierta controversia sobre la transición descrita en la bibliografía entre el agua de baja densidad y el agua de alta densidad.

- **Sub-objetivo 2:** Determinar las condiciones (concentración, temperatura, presión) de agregación de un sistema modelo mediante medidas de velocidad del sonido.

Se desea estudiar la agregación del dodecanoato de sodio (NaL) en agua. Los experimentos realizados bajo diversas condiciones de temperatura y presión nos servirán para conocer el comportamiento de un sistema con capacidad para agregarse y poder tener un punto de partida para estudiar sistemas más complejos. Dicho de otra manera, se pretende utilizar el NaL como sustancia modelo, dada la sencillez de su estructura, para validar la metodología y obtener información original sobre su agregación en agua y a alta presión. Para ello, se harán medidas de velocidad del sonido para disoluciones acuosas de distinta concentración a presión atmosférica en función de la temperatura, así como a temperatura

ambiente y hasta 700 MPa. Con estas medidas de velocidad del sonido se quiere estudiar la variación de la concentración micelar crítica para las disoluciones acuosas de NaL con la temperatura y la presión. El hecho de trabajar a presiones no estudiadas hasta la fecha para este sistema nos permitirá comprobar si la agregación clásica en forma de micelas que presenta el NaL se produce en todo el intervalo de presiones o si, por el contrario, a altas presiones se inducen otros fenómenos.

- **Sub-objetivo 3:** Estudiar el estado de agregación de un sistema proteico complejo a alta presión aplicando las metodologías experimentales y numéricas desarrolladas anteriormente.

Se quiere estudiar el efecto de la presión sobre la agregación de las caseínas en disoluciones acuosas y en leche, sustancias de interés en ciencia y tecnología de los alimentos. Para ello, se seguirá la misma metodología que en las etapas previas de la tesis, es decir, medidas de velocidad del sonido tanto a presión atmosférica como a alta presión y mismo tratamiento de datos.

- **Sub-objetivo 4:** Evaluar el efecto de la presión sobre la interacción agua-moléculas del agregado a través del estudio de las propiedades aparentes de cada sistema

Las propiedades aparentes de un soluto en disolución son el reflejo de las propiedades del propio soluto pero también de cómo éste interactúa con el agua que le rodea. Aquí, nos interesaremos en el volumen específico aparente y en la compresibilidad adiabática aparente de los dos solutos estudiados anteriormente: el dodecanoato de sodio y las caseínas. Se determinará el volumen específico tanto a presión atmosférica como a alta presión para calcular el volumen específico aparente. Se utilizarán las medidas de velocidad del sonido obtenidas en las etapas anteriores de la tesis para calcular la compresibilidad adiabática aparente. Se compararán cualitativamente los comportamientos de cada sistema con la temperatura a presión atmosférica y con la presión a temperatura ambiente.

## 2.1 Referencias

- <sup>1</sup> Wagner W., Pruß A. J.; *Phys. Chem. Ref. Data* **2002**, 31, 387-535.

# ***CAPÍTULO 3***

## ***TÉCNICAS EXPERIMENTALES***

---

### **3.1 Introducción**

Este capítulo está dedicado a explicar los aspectos generales de las técnicas experimentales y los equipos utilizados para los experimentos llevados a cabo en esta tesis. Estos experimentos se han realizado a presión atmosférica y en función de la presión, tanto a temperatura constante como variando la misma entre 253.15 y 348.15 K.

En primer lugar se comentarán los fundamentos técnicos del funcionamiento de los equipos, así como de las partes que los constituyen. Asimismo, se comentarán también los dispositivos anexos asociados a los principales, tales como sensores de presión y temperatura entre otros. Posteriormente se explicarán los procesos de verificación y calibración necesarios para poder utilizar las dos células empleadas a alta presión: la célula de medida de cambios volumétricos y la célula de medida de propiedades acústicas.

Finalmente, se comentarán cómo se lleva a cabo el tratamiento general de los datos obtenidos mediante diferentes herramientas matemáticas e informáticas.

## 3.2 Dispositivos

### 3.2.1 Medida de la densidad y velocidad del sonido a presión atmosférica

Para cada disolución se ha medido su densidad y velocidad del sonido a presión atmosférica. Para ello se utilizó un densímetro Anton Paar DSA 5000M<sup>1</sup> (GmbH Graz, Austria) (véase Figura 3.1). La medida de la densidad se basa en la medida del periodo de oscilación de un tubo de cristal de boro-silicato en forma de “U” oscilante, que es inducido a vibrar. Gracias al volumen calibrado de muestra del tubo y del periodo de oscilación se conoce la densidad. Este densímetro considera el amortiguamiento de la oscilación del tubo en forma de “U” causado por la viscosidad de la muestra y así, compensa automáticamente la influencia de ésta en la determinación de la densidad. Con este equipo se ha trabajado en un intervalo de temperatura desde 273.15 K hasta 343.15 K. La medida de la velocidad del sonido utiliza la técnica de transmisión. La celda específica para esta medida está compuesta por un transmisor de ultrasonidos en un lado y un receptor en el lado opuesto. El transmisor emite ondas de sonido de un periodo conocido a través de la muestra. La velocidad del sonido puede ser calculada determinando el periodo de recepción de las ondas y teniendo en cuenta la distancia entre el emisor y el receptor. Mediante un termómetro de platino Pt 100 montado en el interior de la celda en la que se realizan las medidas, se controla la temperatura con una resolución de 0.001 K.

Este equipo permite medir la densidad entre 0 y 3 g·cm<sup>-3</sup> con una resolución de 0.000001 g·cm<sup>-3</sup> y la velocidad del sonido entre 1000 y 2000 m·s<sup>-1</sup> con una resolución de 0.01 m·s<sup>-1</sup>.



**Figura 3.1.** Equipo Anton Paar DSA 5000M utilizado para las medidas de densidad y velocidad del sonido a presión atmosférica.

El equipo viene calibrado de fábrica y al comenzar cada día la experimentación se debe hacer un proceso de verificado para comprobar que el equipo medirá correctamente durante los experimentos a realizar en la jornada de trabajo. La

verificación consiste en introducir una muestra de agua Milli-Q y esperar que se alcance la temperatura de referencia en la calibración. Una vez tomada la medida, si las desviaciones con respecto al valor de la densidad y la velocidad del sonido de referencias son inferiores a  $0.0000050 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  y  $0.030 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectivamente, el equipo indica que la verificación es correcta y se puede empezar a utilizar.

Al final de cada medida y experimento se debe limpiar escrupulosamente el equipo. Para ello se hace pasar agua Milli-Q por el circuito por medio de una jeringuilla moviendo el émbolo de la misma para arrastrar las posibles partículas que se hubiesen podido quedar adheridas al interior del tubo de vidrio. A continuación, se hace pasar etanol del mismo modo que el agua para una limpieza más exhaustiva. Finalmente, se enciende la bomba de aire que tiene el equipo para secar el interior del tubo en forma de “U” de vidrio. El equipo queda así limpio y seco para ser utilizado al día siguiente, haciendo previamente la verificación arriba mencionada.

Como se discutirá posteriormente en el apartado de resultados, estas medidas de densidad y velocidad del sonido han permitido, además de determinar la concentración molar de las disoluciones de trabajo a partir de la concentración molal y las medidas de densidad, determinar las propiedades molares aparentes de las disoluciones de dodecanoato de sodio y caseinato de sodio.

### 3.2.2 Dispositivo experimental para la medida de propiedades a alta presión

- **Descripción general**

El dispositivo está compuesto por una vasija de alta presión, un equipo de bombeo, dos cabezales para medir diferentes propiedades termofísicas y una unidad de control. Este equipo es un prototipo a escala de laboratorio, diseñado para medir propiedades termofísicas en líquidos. Ha sido fabricado por UNIPRESS en el Instituto de Física de Altas Presiones de la Academia Polaca de Ciencias, Varsovia (Polonia).<sup>2</sup> El equipo de alta presión está provisto de varios termopares y de un sensor de presión, y se complementa con un sistema de adquisición de datos conectado a un ordenador y un equipo de termostatización. Para las medidas de cambio de volumen tiene acoplado un transformador diferencial de variable lineal (LVDT), cuyos detalles y funcionamiento se explicarán más adelante. Para las medidas ultrasónicas, consta, además, de un generador de pulsos y un osciloscopio. En la Figura 3.2.a se muestra una imagen del dispositivo, así como un esquema del mismo (Figura 3.2.b).

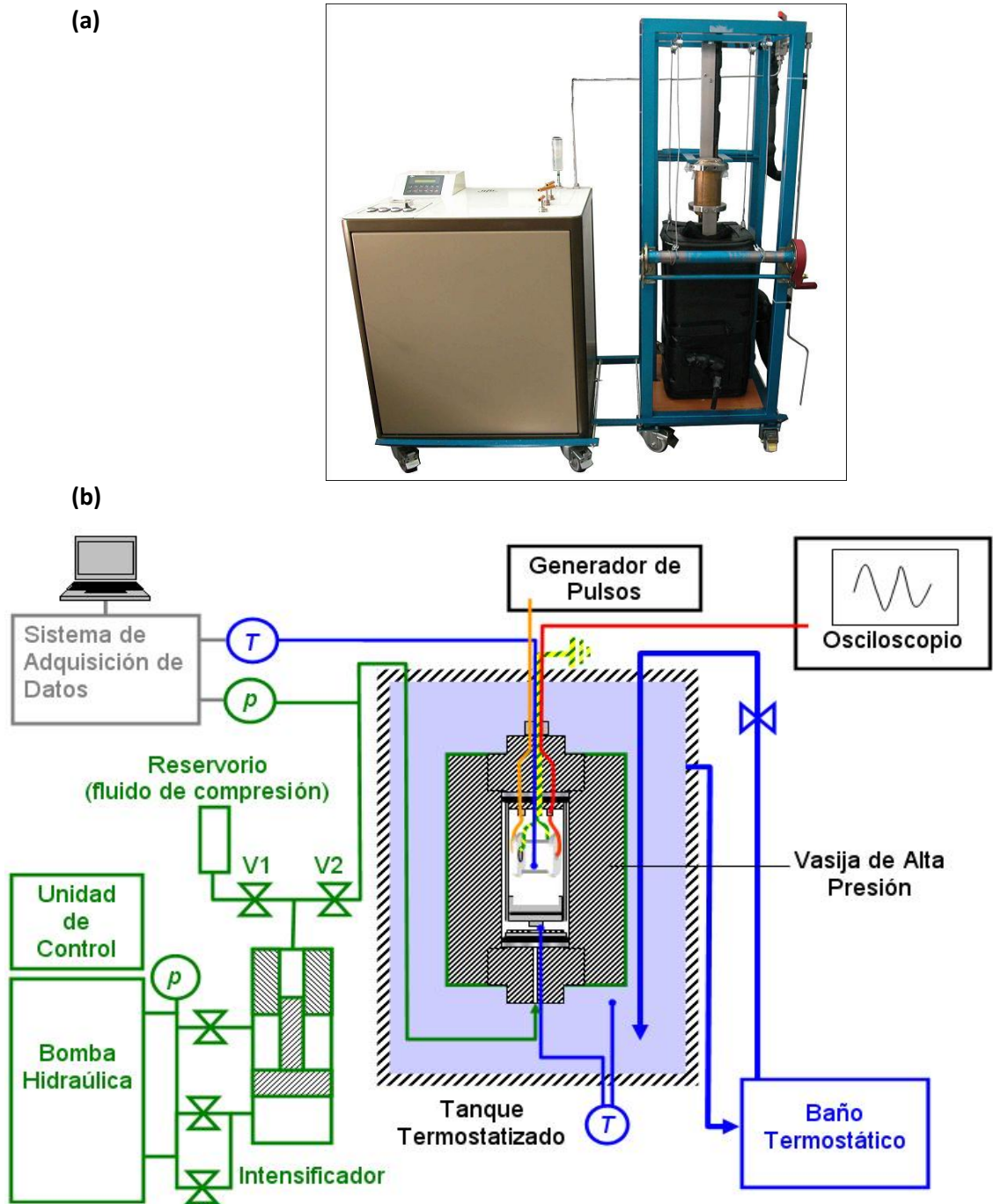
### 3.2.2.1 Equipo de alta presión

A continuación se van a describir las partes de las que consta el equipo de alta presión utilizado en esta tesis.

- **Equipo de bombeo, intensificador y unidad de control**

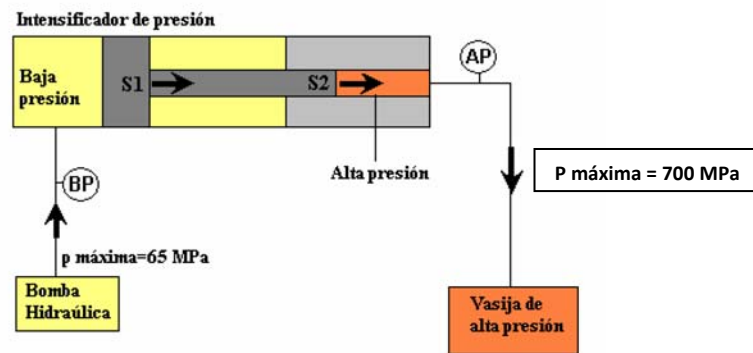
El equipo de bombeo suministra presión de forma hidrostática a través de un fluido presurizador a la vasija de alta presión. Está formado por una bomba hidráulica, un intensificador de presión y dos transductores de presión: uno para medir alta presión, *AP*, y otro para medir baja presión, *BP*. En la Figura 3.3 se ha representado un esquema de cómo transmite la presión el equipo. La bomba hidráulica (Grupo Rexroth Bosch Ltd., Polonia)<sup>3</sup> suministra una presión máxima de 65 MPa al fluido de presurización de la parte de baja presión del intensificador de presión (X US/2003, Unipress, Polonia). El pistón del intensificador se mueve, por tanto, debido a la presión generada. En la parte de alta presión, la sección del pistón (*S2*) es más pequeña que la sección (*S1*) en la parte de baja presión, por lo que la presión allí es mayor. Esta presión es la que se transmite posteriormente a la vasija de alta presión. El intensificador de presión tiene una capacidad de 30 mL y está fabricado en acero inoxidable (17-4 PH).

El transductor *AP* (0-700 MPa, EBM6045, Erich Brosa Messgeräte GMBH/KGT Kramer, Alemania)<sup>4</sup> mide la presión producida por el intensificador de presión y el transductor *BP* mide la presión liberada por la bomba hidráulica. Las señales de salida de los transductores de presión llegan a la unidad de control y son visualizadas en una pantalla situada en la mesa de control (véase Figura 3.4). El equipo de bombeo y la unidad de control están provistos de un convertidor de frecuencia (5 - 50 Hz), que permite controlar la velocidad de incremento de la presión. Esta velocidad se establece mediante un potenciómetro localizado en la mesa de control. A través de un teclado se controla todo el proceso, introduciendo el valor de presión deseado.



**Figura 3.2.** (a) Imagen del equipo de alta presión utilizado en este trabajo. (b) Esquema del equipo de alta presión. T: termopares tipo T. V1, V2: válvulas manuales. P: sensor de presión.





**Figura 3.3.** Esquema de la transmisión de la presión desde la bomba hidráulica hasta la vasija de alta presión. BP: Baja Presión. AP: Alta Presión. S1: sección del pistón del intensificador de presión en la zona de baja presión. S2: sección del pistón del intensificador de presión en la zona de alta presión.



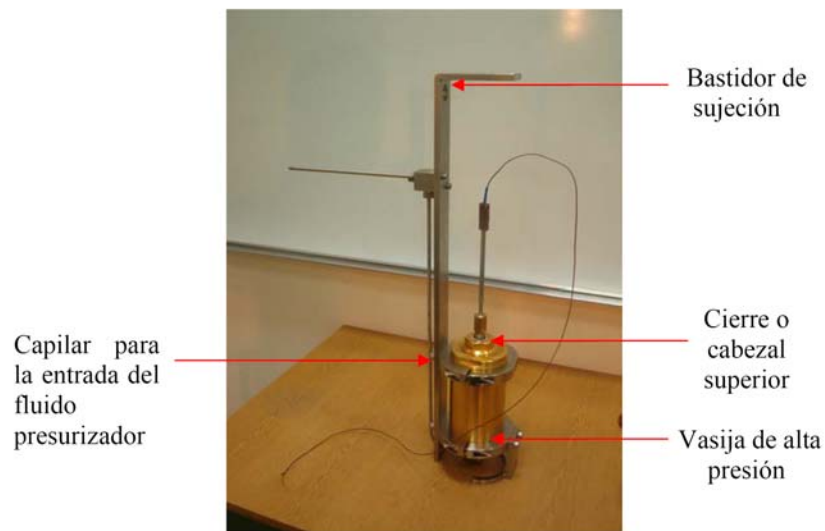
**Figura 3.4.** Mesa de control del equipo de alta presión.

- **Vasija de alta presión**

La vasija de alta presión que se muestra en la Figura 3.5 es un cilindro de pared gruesa de una aleación de cobre y berilio (CuBe, Berylco 25), y recubierto por una película de oro. Tiene una capacidad de 45 mL, un diámetro interno de 30 mm, un diámetro exterior de 100 mm, una altura interior de 64 mm, y una altura exterior de 198 mm. Ha sido diseñada para trabajar hasta una presión de 700 MPa y en un intervalo de temperaturas desde 233.16 K hasta 373.16 K.

Esta vasija está compuesta de dos cierres de acero inoxidable (1.4542 AISI 630), uno inferior y otro superior. El cierre inferior dispone de un conector capilar por el que entra el fluido presurizador (aceite de silicona, M40.165.10). El cierre o cabezal superior sirve para cargar la vasija con la muestra y para alojar las diferentes células de medida diseñadas al efecto para la determinación de propiedades físicas (velocidad del sonido o cambio de volumen) como se ha representado en las Figura 3.2.b y 3.5.

Además, la vasija contiene en la parte inferior un termopar de metal blindado, tipo T, para la medida de la temperatura.



**Figura 3.5.** Vasija de alta presión.

### 3.2.2.2 Sistema de medida de propiedades volumétricas

Para la determinación de las propiedades volumétricas se utilizó una célula capaz de medir cambios de volumen de la muestra debido a variaciones de presión y de temperatura.

El sistema consta de un contenedor de muestras con un pistón sólido flotante y un sensor de posición. Este sensor es capaz de medir los desplazamientos que experimenta el pistón flotante cuando la muestra sufre un cambio de volumen debido a una variación de presión o de temperatura (Figura 3.6).

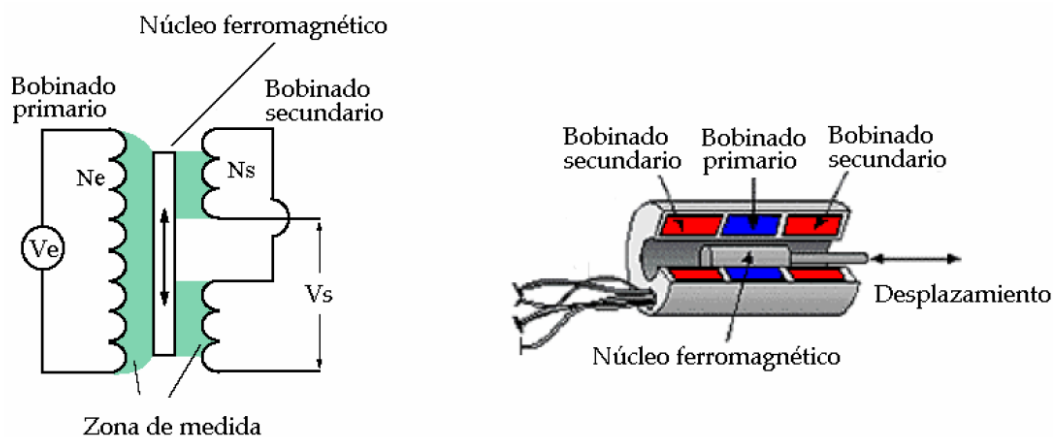


**Figura 3.6.** Sistema de medida de propiedades volumétricas.

Como sensor de posición del pistón se eligió el Transformador Diferencial de Variable Lineal (LVDT) (véase Figura 3.7) que es un transductor electromecánico que puede convertir el movimiento rectilíneo de un objeto al que está acoplado mecánicamente, en una señal eléctrica. Está compuesto por un transductor tipo Pan 20s con un puente de medida tipo MPL701 (Peltron Ltd, Polonia)<sup>5</sup>. Se eligió este transductor debido a su alta resolución (aproximadamente  $1 \cdot 10^{-6}$  m), a su nulo rozamiento, puesto que no hay contacto mecánico entre el núcleo del LVDT y el bobinado, y a su alta repetibilidad. Consta de un bobinado primario, dos bobinados secundarios y un núcleo de material ferromagnético (ferrita). Para su funcionamiento, se aplica una corriente alterna ( $U_e$ ) en un bobinado primario que produce un campo magnético variable alrededor del núcleo. Este campo magnético induce un voltaje en el bobinado secundario que está en la proximidad del núcleo. El voltaje de la señal inducida en el bobinado secundario ( $U_s$ ) es una relación lineal del número de espiras ( $N$ ). La relación básica del LVDT es:

$$\frac{U_s}{U_e} = \frac{N_s}{N_e} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde  $U_s$  es la tensión de salida,  $U_e$  es la tensión de entrada,  $N_s$  es el número de espiras del bobinado secundario y  $N_e$  el número de espiras del bobinado primario. Cuando el núcleo se desplaza,  $N_s$  cambia de forma lineal. Por lo tanto, la amplitud de la señal inducida,  $U_s$ , que se mide en el sistema de adquisición de datos, varía también linealmente con el desplazamiento del pistón.



**Figura 3.7.** Esquema del transformador diferencial de variable lineal (LVDT).

Para llevar a cabo las medidas, todo el sistema (vasija, fluido presurizador, contenedor de muestra y muestra) se atempera a la temperatura de trabajo  $T$ . Al comienzo del experimento, la muestra se encuentra en las condiciones iniciales de

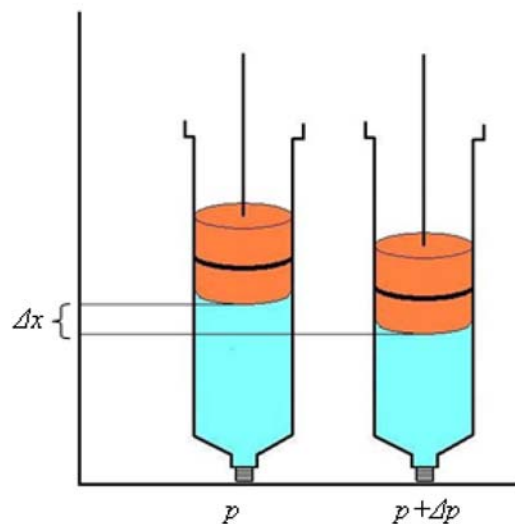
volumen  $V_p$ , de presión  $p$ , y el pistón se encuentra en la posición inicial  $x_p$ . Posteriormente, se comprime la muestra un incremento de presión  $\Delta p$ , hasta un valor de presión  $(p + \Delta p)$ , lo que implica un aumento de la temperatura y una disminución del volumen que provoca un desplazamiento del pistón ( $x_{p+\Delta p}$ ), como se muestra en la Figura 3.8. A continuación, se espera a que todo el sistema esté de nuevo atemperado a la temperatura de trabajo  $T$  (al menos se deben esperar 10 minutos). En este instante la muestra ocupa un volumen  $V_{p+\Delta p}$  y el pistón se encuentra en la posición  $x_{p+\Delta p}$ .

A partir de las medidas de los valores de temperatura, de presión y de posición del pistón, que deben ser constantes cuando se alcanza el equilibrio térmico en cada presión, se dispone de todos los datos para obtener el volumen específico en función de la presión y la temperatura  $V(p, T)$ .

De este modo, la disminución de volumen experimentado por la muestra se determina a partir del desplazamiento del pistón según la siguiente ecuación:

$$\Delta V = \pi \cdot r^2 \cdot D \quad \text{Ecuación 3.2}$$

donde  $r$  es el radio interno del contenedor de muestra y  $D$ , que es igual a  $x_p - x_{p+\Delta p}$ , es el desplazamiento recorrido tras una compresión.

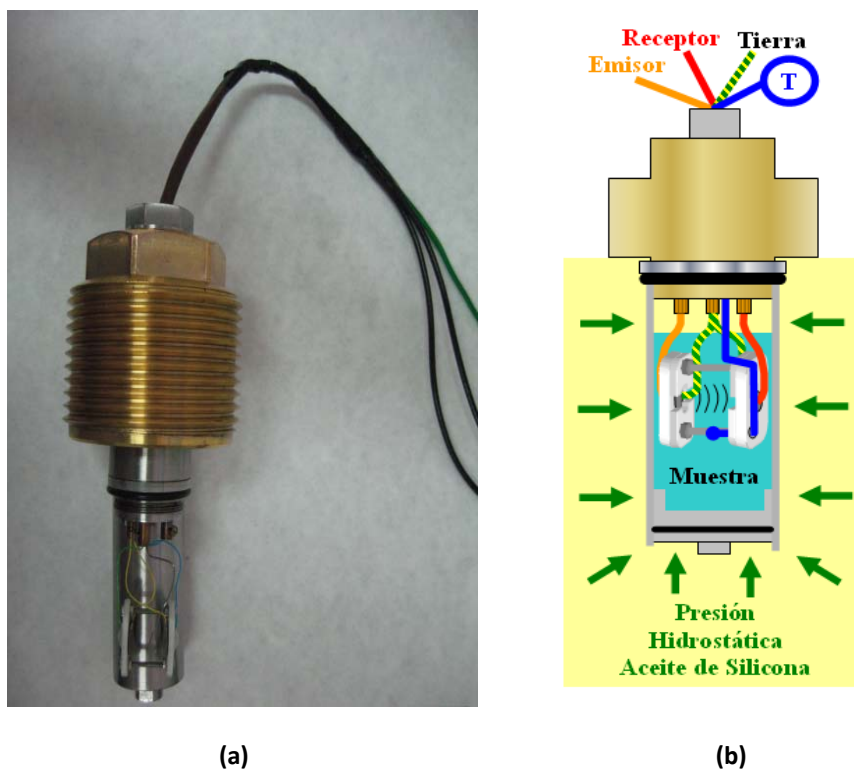


**Figura 3.8.** Representación de la variación de volumen tras una compresión.

### 3.2.2.3 Sistema de medida de propiedades acústicas

La técnica elegida para llevar a cabo las medidas fue la transmisión de ultrasonidos. El montaje consiste en dos piezoeléctricos enfrentados en el interior de un cilindro portamuestras como se puede observar en la Figura 3.9. El generador de

pulsos (Panametrics 5072PR, Waltham, USA)<sup>6</sup> emite una señal eléctrica que es convertida en señal mecánica por el piezoeléctrico emisor ( $E$ ) que atraviesa la muestra, y el pulso es detectado por el piezoeléctrico receptor ( $R$ ), colocado a una distancia  $d$ . En un osciloscopio (Tektronix TDS5032B, Oregon, USA)<sup>7</sup> se visualizan las señales emitidas y recibidas por los piezoeléctricos de forma continua.



**Figura 3.9. (a)** Dispositivo completo para las medidas ultrasónicas con las diferentes partes: cabezal, contenedor cilíndrico portamuestras y célula de medida de propiedades acústicas. **(b)** Esquema de dicho dispositivo.

La célula de medida de propiedades acústicas fue construida en el Instituto de Física de Altas Presiones de la Academia Polaca de Ciencias, Varsovia (Polonia).<sup>2</sup> La célula soporta una presión máxima de trabajo de 700 MPa, y el intervalo de temperatura que admite es desde 233.15 K hasta 353.15 K. Las partes de las que consta la célula son las siguientes:

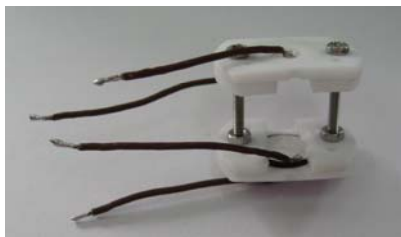
- Un contenedor de muestra cilíndrico de 69 mm de altura y 25 mm de diámetro con un volumen útil aproximado de 20 mL (véase Figura 3.10.a). El fondo de este contenedor es un pistón flotante mostrado en la Figura 3.10.b, que permite la variación del volumen de la muestra cuando ésta es sometida a un cambio de presión o de temperatura. El pistón dispone de un tornillo de purga en su base, para la evacuación del aire de la muestra en el momento del

llenado, y tiene una junta tórica de NBR (*nitrile butadiene rubber*) a su alrededor para garantizar la estanqueidad del contenedor de muestra.



**Figura 3.10. (a)** Contenedor cilíndrico para albergar la muestra. **(b)** Pistón flotante alojado en la parte interior del contenedor de muestra.

- Un dispositivo de medida de propiedades acústicas cuya fotografía se muestra en la Figura 3.11. Consta de dos piezoeléctricos (Pz26, Ferroperm Piezoceramics® A/S, Kvistgard, Dinamarca)<sup>8</sup> de 2 MHz de frecuencia, 0.93 mm de espesor y 10.08 mm de diámetro, enfrentados paralelamente a una distancia  $d$ , que como se verá más adelante en la sección 3.3.1.2 se ha determinado en los calibrados, y suele ser del orden de 14 mm al iniciar el experimento a presión atmosférica. Los piezoeléctricos son de titanato zirconato de plomo recubiertos por una fina capa de plata. El piezoeléctrico  $E$  es el emisor de pulsos y el piezoeléctrico  $R$  es el receptor. Cada piezoeléctrico se encuentra insertado en una capa de politetrafluoroetileno (PTFE), para minimizar reflexiones y dispersiones de los pulsos de ultrasonidos, y lleva alrededor una junta tórica que los protege del efecto de la compresión. Cada piezoeléctrico se sujeta mediante una segunda placa de PTFE formando un sándwich. Las dos capas de PTFE tienen unos tornillos pasantes de acero inoxidable que mantienen el paralelismo entre ambas capas con ayuda de unas tuercas. El dispositivo de medida cuenta además con cuatro cables: uno soldado a la parte exterior del piezoeléctrico emisor, otro soldado a la parte exterior del piezoeléctrico receptor, y un tercero y cuarto que van conectados a tierra y están soldados a las capas interiores de los dos piezoeléctricos. Los cuatro cables se conectan al cabezal de la célula de medida de propiedades acústicas.



**Figura 3.11.** Dispositivo de medida de propiedades acústicas.

- Cabezal de acero inoxidable y aleación de cobre-berilio cuya fotografía se muestra en la Figura 3.12. Consta de dos juntas tóricas. El cabezal está atravesado por tres cables eléctricos que unen el dispositivo de medida, situado dentro del contenedor de muestra, con el resto del dispositivo de medidas acústicas (osciloscopio y generador de pulsos). El cabezal también dispone de un termopar blindado tipo T, para poder registrar la temperatura en el interior de la muestra.



**Figura 3.12.** Cabezal de la célula de medida de propiedades acústicas.

#### 3.2.2.4 Dispositivos anexos

- **Baño termostático**

La correcta determinación de las propiedades medidas requiere que las mismas se realicen a temperatura constante. Para ello, se emplea un baño termostático (Haake K, Karlsruhe, Alemania)<sup>9</sup> con un intervalo de trabajo desde 233.15 hasta 423.15 K.

El baño se conecta mediante un sistema de mangueras a un tanque en el que se encuentra sumergida la vasija de alta presión como se ha representado en la Figura

3.2.b. De esta forma, la circulación continua del líquido refrigerante permite conseguir una temperatura constante en un intervalo de  $\pm (0.1 - 0.3)$  K en la muestra para realizar las medidas. Todo el sistema se encuentra aislado térmicamente con el fin de disminuir al máximo la transferencia de calor.

- **Sistema de adquisición de datos**

Consiste en un recolector de datos (DC100 Data Collector Yokogawa, Tokyo, Japón)<sup>10</sup> conectado a un ordenador, en el que se reciben las siguientes señales a través de los correspondientes canales:

- Temperatura de la muestra ( $^{\circ}\text{C}$ ), medida por el termopar situado en el interior del cilindro portamuestras, (indicado con una letra T en la Figura 3.2.b).
- Temperatura del baño ( $^{\circ}\text{C}$ ), medida a través de un termopar tipo T, sumergido en el tanque termostático donde se encuentra la vasija de alta presión, (indicado con una letra T en la Figura 3.2.b). Los errores asociados a las medidas de las temperaturas de la muestra y del baño a través de sus correspondientes termopares es de unos  $0.14^{\circ}\text{C}$ , valor que se tiene en cuenta en la corrección de las temperaturas.
- Presión en la vasija de alta presión (MPa), medida a través del transductor de presión (AP) situado en el capilar de entrada del fluido presurizador a la vasija de alta presión, (indicado con una letra P en la Figura 3.2.b). La presión se recoge en el sistema de adquisición de datos en términos de voltaje y mediante una calibración dada por el fabricante del transductor de presión, ésta se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Presión(MPa)} = 70 \cdot \text{Voltaje(V)} + 0.1 \quad \text{Ecuación 3.3}$$

La incertidumbre dada por el fabricante para el voltaje es del 0.5 %, a la que hay que añadirle la experimental, es decir, la asociada a cada experimento, puesto que a las diferentes presiones a las que se somete la muestra, la presión va cambiando y se toma un valor medio durante los últimos 45 segundos del experimento. Ese valor medio de la presión no suele tener una desviación estándar superior a 0.05 MPa hasta una presión de unos 500 MPa, de manera que la desviación estándar promedio hasta este valor de presión es de unos 0.03 MPa. A partir de 500 MPa la desviación estándar es mayor, tomando un valor máximo de 4 MPa, aunque la



desviación estándar media en el intervalo de 500 a 700 MPa es de unos 1.4 MPa.

Previamente a la realización de los experimentos, los termopares fueron calibrados por el servicio de Calidad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN)<sup>11</sup> mediante un sistema de calibración portátil, DBC 150-TS (Druck, Italia).<sup>12</sup>

Todas las señales indicadas son recogidas por el sistema de adquisición de datos y pueden ser visualizadas en tiempo real en el monitor del ordenador a través de un software que permite, a su vez, la grabación de las mismas. En nuestras medidas hemos fijado que se almacenen a lo largo de todo el experimento las diferentes señales cada 2 segundos para los experimentos de medida de velocidad del sonido, y cada 0.5 segundos para las medidas de cambio de volumen.

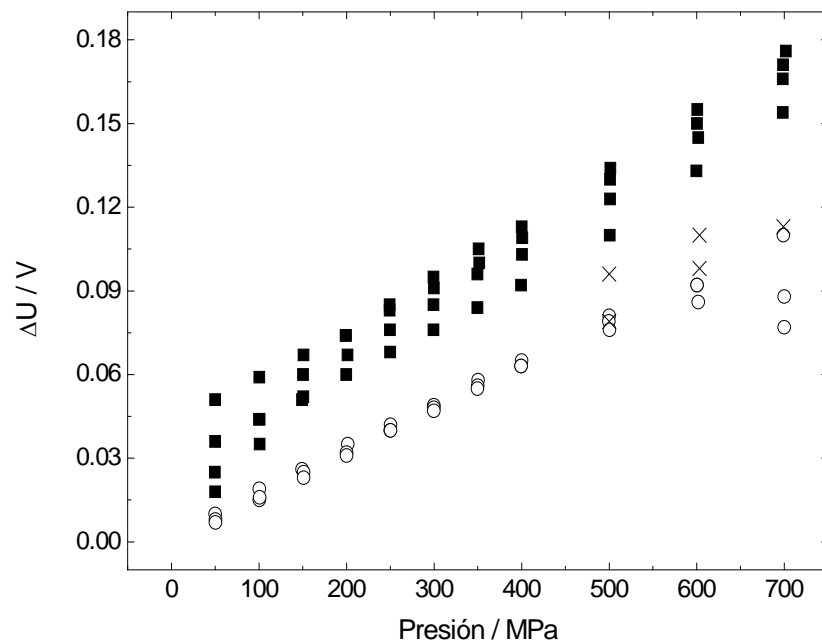
### **3.3 Procedimientos experimentales**

#### **3.3.1. Verificación y calibración de los equipos**

##### **3.3.1.1 Calibración del equipo de medida de cambio de volumen**

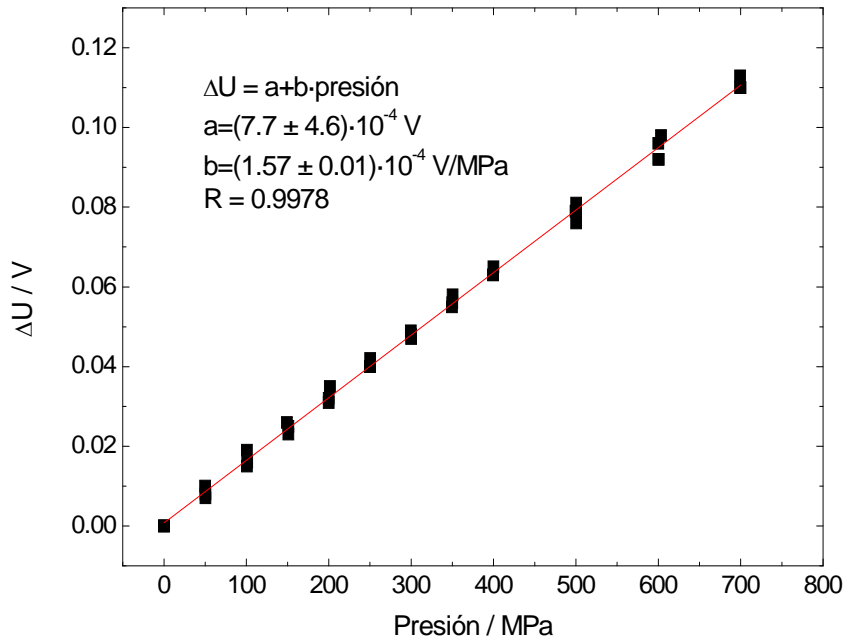
Considerando lo explicado en la sección 3.1.1.2, el calibrado del dispositivo consiste en determinar la relación lineal que existe entre el voltaje medido y el cambio en el desplazamiento experimentado por el sistema. Antes de hacer este calibrado con la muestra se ha analizado cómo cambia sin muestra.

Para calibrar el dispositivo se dejó el émbolo en reposo en el fondo del recipiente y se sometió a presión el conjunto cilindro portamuestras más el émbolo rodeado de aceite de silicona para transmitir la presión. Puesto que no hay muestra, el émbolo se encuentra inmóvil en el fondo del recipiente. La presión provoca la compresión hidrostática del émbolo y del recipiente reduciendo sus dimensiones. Esta reducción de las dimensiones, aunque es mínima, se traduce en un voltaje registrado por el sistema LVDT que se contabilizará como una variación del volumen de la muestra si no se fuera a corregir. En la Figura 3.13 podemos ver la variación del voltaje debido a esta deformación del propio sistema de medida con la presión para diversas configuraciones.



**Figura 3.13.** Variación del voltaje del sistema de medida de cambio de volumen sin muestra para las dos configuraciones de calibración. (■) Tornillo de purga cerrado. (○) Tornillo de purga abierto. (×) Sin tornillo de purga.

Se comprobó que al aplicar presión al sistema, los elementos que forman la célula de medida de cambio de volumen sufren una pequeña deformación elástica y lineal que no es excesivamente grande pero que se debe tener en cuenta debido a la gran sensibilidad que se necesita para las medidas de cambio de volumen. También se observó que, cuando los experimentos se realizaron con el tornillo de purga cerrado, los valores iniciales del voltaje no eran iguales y había mucha variabilidad de un experimento a otro. En ambos experimentos, tanto con el tornillo de purga abierto como con el tornillo de purga cerrado, se apreció que la variación de voltaje sigue la misma pendiente, por lo que lo único que varía es la posición inicial del émbolo. La hipótesis que se planteó sobre lo que estaba ocurriendo en el interior del cilindro portamuestras es que cuando el tornillo de purga estaba cerrado, el émbolo no se quedaba en su posición inicial real, es decir, en contacto con el fondo del recipiente. Al enroscar el cilindro portamuestras al cabezal, el émbolo subía unos 100 micrómetros al introducirse por debajo una pequeña cantidad de aceite de silicona que no se podía escapar por otra parte. Si se observan los resultados de la Figura 3.13, obtenidos cuando el tornillo de purga se mantuvo abierto, observamos que la posición inicial es correcta (variación de voltaje nula a presión atmosférica, es decir, que no se produce deformación puesto que no se está aplicando presión). Mediante una regresión lineal obtuvimos con estos datos la recta de calibración que se muestra en la Figura 3.14.



**Figura 3.14.** Variación del voltaje con la presión para el dispositivo de medida de cambio de volumen sin muestra en la configuración con el tornillo de purga abierto.

Por lo tanto, se ha aplicado la siguiente corrección a las medidas de voltaje que se han realizado con las diferentes disoluciones en función de la presión:

$$U_{real} = U_{medido} - 0.000157 \cdot p - 0.000774 \quad \text{Ecuación 3.4}$$

donde el voltaje  $U$  está en V y la presión  $p$  en MPa.

Y de forma más práctica, para la variación de voltaje, desde la posición inicial del émbolo,  $U_{inicial}$ , medida a presión atmosférica, hasta su posición final bajo presión,  $U_{medido}$ :

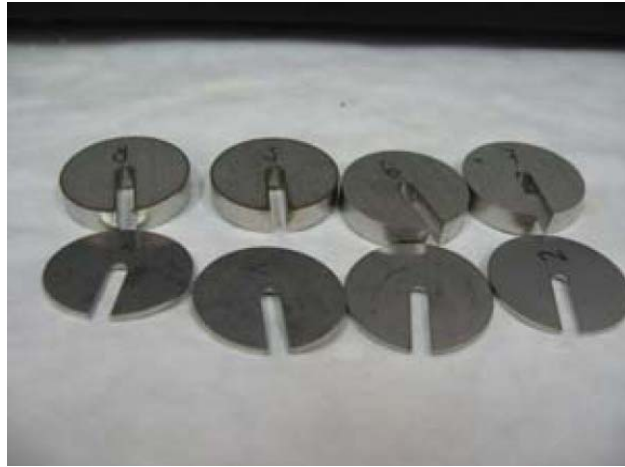
$$\Delta U_{real} = U_{inicial}^{real} - U_{real}(p) = \Delta U_{medido} - 0.000157 \cdot \Delta p \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Donde  $\Delta U_{medido} = U_{inicial} - U_{medido}(p)$  y  $\Delta p$  es la variación de presión ( $p_{inicial} - p$ ) en MPa, por lo que  $U_{real}$  y  $\Delta U_{real}$  son los valores de voltaje corregidos que habrá que utilizar para calcular el correspondiente cambio de volumen de la disolución.

- **Calibración del dispositivo LVDT**

El sistema LVDT se calibró para poder obtener la relación entre el desplazamiento del pistón flotante, en términos de longitud,  $D$ , y el voltaje de salida,  $U_s$ . Para ello, se emplearon los patrones cilíndricos de acero que se muestran en la Figura 3.15 de distintos espesores medidos con un calibre electrónico (Sylvac System,

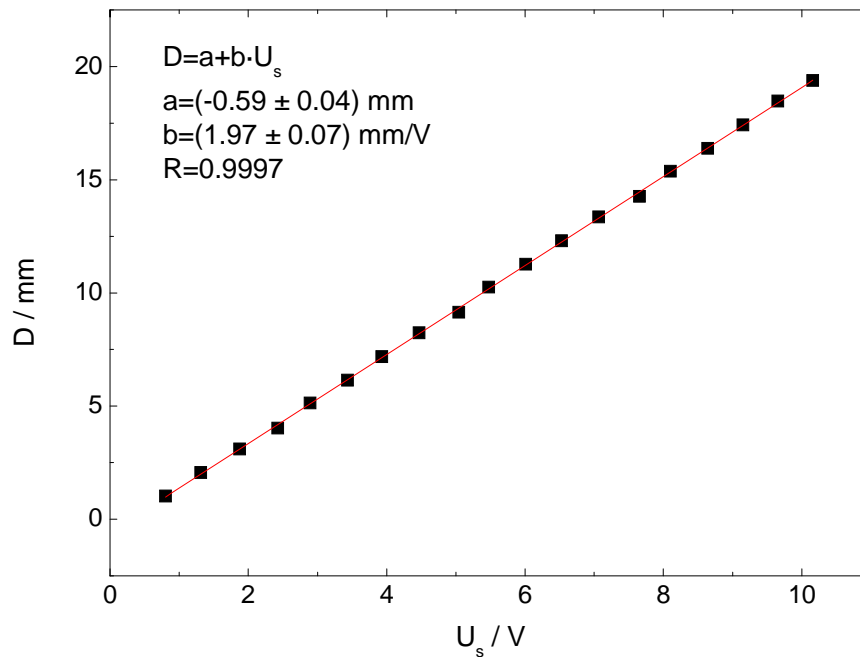
Basic Vis, Polonia)<sup>13</sup> de precisión 0.01 mm. Estos patrones pueden emplearse de uno en uno o bien agrupados, siendo  $D$  la suma de los espesores de los patrones utilizados.



**Figura 3.15.** Patrones cilíndricos utilizados en la calibración del sistema LVDT.

Variando la distancia del pistón desde cero hasta su recorrido máximo con los distintos patrones, varía también la posición del núcleo ferromagnético en el interior de los bobinados del LVDT (Figura 3.7) y se induce un voltaje  $U_s$  desde cero hasta el voltaje correspondiente al desplazamiento máximo permitido, 10 V, a partir del cual ya se pierde la linealidad. Mediante un ajuste por mínimos cuadrados de los pares de valores obtenidos  $U_s - D$ , se obtuvo la relación lineal que existe entre el desplazamiento del pistón y el voltaje inducido, como se muestra en la Figura 3.16.

El sistema LVDT se calibró de esta manera cada vez que se empezaba una nueva serie de experimentos o cuando varió el cero de referencia por circunstancias externas, como ruptura o calibración periódica del dispositivo en un control de calidad.



**Figura 3.16.** Relación entre el desplazamiento del pistón flotante en términos de longitud ( $D$ ) y el voltaje de salida  $U_s$  para la calibración del sistema LVDT. Los símbolos representan las medidas y la línea continua un ajuste lineal de dichos datos.

Para la puesta a punto y verificación del buen funcionamiento de esta célula se empleó agua desgasificada Milli-Q como sustancia de calibración, dado que sus propiedades son bien conocidas a alta presión.

### 3.3.1.2 Calibración de la célula de medida de propiedades acústicas

La velocidad del sonido es una propiedad muy sensible a pequeñas variaciones de temperatura, por lo que es fundamental conocer su valor con precisión y mantenerla lo más constante posible a lo largo de los experimentos. El termopar que mide los valores de temperatura se calibró con dos resistencias de platino Pt100 usadas como referencia (TESTO, modelo 735-2 y modelo 950, Alemania)<sup>14</sup> con una incertidumbre inferior a 0.09 K, dependiendo de la temperatura a la que se trabaje. El transductor de presión fue calibrado por el fabricante (KGT Kramer, Dortmund, Alemania)<sup>15</sup> con una incertidumbre relativa del 0.5 %.

La distancia entre los dos piezoelectricos cerámicos se calibró midiendo agua Milli-Q a 50 MPa para temperaturas por encima de 273.15 K y a la primera presión de medida para temperaturas por debajo de 273.15 K, es decir, se calibró a la presión de 75 MPa para 268.15 K, a 125 MPa a 263.15 K, a 175 MPa a 258.15 K y a 200 MPa a 253.15 K. Se observó que era preferible calibrar la distancia entre los piezoelectricos bajo presión para evitar inexactitudes debido a la presencia de burbujas de aire a

presión atmosférica. Las presiones de referencia elegidas a cada temperatura eran lo suficientemente altas como para evitar tal efecto pero lo más cerca posible a la presión atmosférica en la que los valores de velocidad del sonido son conocidos con mucha exactitud. La precisión de la ecuación propuesta por el IAPWS-95<sup>16</sup> a esas presiones relativamente bajas, garantiza la buena calidad de la calibración.

Para obtener la distancia entre los dos piezoelectricos,  $d_{cal}$ , el tiempo de vuelo,  $\tau_{cal}$ , que se define como el tiempo que tarda una onda en ir desde el piezoelectrico emisor al piezoelectrico receptor y volver en las condiciones de calibración, se multiplicó por la velocidad del sonido,  $u_{s,cal}$ , calculada a partir de la IAPWS-95<sup>16</sup> en las mismas condiciones de presión y temperatura del experimento según la siguiente ecuación:

$$d_{cal} = u_{s,cal}(p_{cal}, T_{cal}) \cdot \frac{\tau_{cal}}{2} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

También se tuvo en cuenta la deformación de los tornillos de la célula de medida con el objetivo de refinar el valor de la distancia a una presión dada mediante la siguiente relación:

$$d_p = d_{cal} \frac{1 - \frac{p \cdot (1 - 2\mu)}{E}}{1 - \frac{p_{cal} \cdot (1 - 2\mu)}{E}} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

donde  $\mu$  es el coeficiente de Poisson y  $E$  el módulo de Young que, para el tipo de acero inoxidable utilizado en la célula, toman un valor de 0.3 y 193 GPa,<sup>17</sup> respectivamente.

La velocidad del sonido a una presión dada se obtiene a partir del tiempo de vuelo,  $\tau_p$ , y la distancia entre los piezoelectricos cerámicos,  $d_p$ , usando la siguiente ecuación:

$$u_s(p) = \frac{2 \cdot d_p}{\tau_p} \quad \text{Ecuación 3.8}$$

O, más explícitamente, a partir de las ecuaciones (3.6 – 3.8) y en términos de las magnitudes medidas:

$$u_s(p) = \frac{\tau_{cal}}{\tau_p} \frac{1 - p \left( \frac{1 - 2\mu}{E} \right)}{1 - p_{cal} \left( \frac{1 - 2\mu}{E} \right)} u_{s,cal} \quad \text{Ecuación 3.9}$$

### 3.3.2 Procedimiento de las medidas

#### 3.3.2.1 Medidas de velocidad del sonido

Para asegurar la reproducibilidad de las medidas y minimizar en todo lo posible los errores asociados a cada experimento, se formularon dos protocolos de trabajo. En el caso de las medidas de velocidad del sonido éste consistía en introducir la muestra previamente desgasificada en el contenedor cilíndrico, donde se aloja el dispositivo para medir la velocidad del sonido, con cuidado de no introducir burbujas de aire. El contenedor se termina de rellenar con aceite de silicona para evitar el contacto de la parte eléctrica de la célula de medida con la muestra. A continuación, se enrosca parcialmente el contenedor de muestra al cabezal y se purga por la parte inferior del mismo hasta que salen unas gotas de la muestra. Se termina de enroscar por completo el contenedor de muestra, se cierra el tornillo de purga y se introduce la célula de medida de propiedades acústicas en la vasija de alta presión, atemperada a la temperatura  $T$  seleccionada para el experimento. El siguiente paso consiste en conectar los cables del dispositivo de medida de propiedades acústicas (emisor, receptor y tierra) al osciloscopio y al generador de pulsos. En este punto se espera un mínimo de 15 minutos para que la muestra llegue al equilibrio térmico, esto se comprueba observando que la temperatura del termopar del tanque de termostatización y la temperatura del termopar de dentro de la muestra sea igual. Cuando esto ocurre se procede a tomar la medida correspondiente a presión atmosférica.

La vasija de alta presión se encuentra sumergida en agua o en etanol en el tanque termostático, dependiendo de si los experimentos se realizan por encima o por debajo de 273.15 K. Mediante la inmersión de la vasija de alta presión a lo largo de todo el experimento en el fluido correspondiente, se consigue el control de la temperatura. Mediante un generador de pulsos ultrasónicos se emite un pulso al piezoeléctrico emisor  $E$ . La onda mecánica generada se propaga a través de la muestra hasta que la detecta el piezoeléctrico receptor  $R$ , y la señal generada se visualiza y se recoge en el osciloscopio en tiempo real. Debido a que en los experimentos de esta tesis la resolución necesaria para detectar las pequeñas variaciones de la velocidad del sonido es alta, el osciloscopio se configura en modo “*average*” para obtener un promedio exponencial de la señal recibida. También se configura el tiempo de adquisición de la señal para que éste sea cada 800 ps. En las medidas a alta presión, ésta es generada por la bomba hidráulica y se transmite a lo largo de todo el sistema

mediante el fluido presurizador. El pistón flotante del contenedor de muestra es el que permite que se produzca la variación de volumen.

Una vez registrada la medida a presión atmosférica en el osciloscopio se procede a aumentar la presión a los valores seleccionados. El procedimiento es siempre el mismo: se presuriza el equipo a la presión deseada y se espera un mínimo de 10 minutos para que se alcance el equilibrio térmico antes de realizar la medida de la señal en el osciloscopio. Una vez estabilizadas la presión y la temperatura se realiza la medida ultrasónica y, a continuación, se incrementa la presión de nuevo. Dependiendo de la sustancia estudiada y la temperatura de trabajo los valores de los incrementos de presión han sido diferentes, siendo el incremento más pequeño de 5 MPa en el caso del agua a temperaturas por debajo de 273.15 K y el mayor de 100 MPa en el caso del caseinato de sodio a 298.15 K.

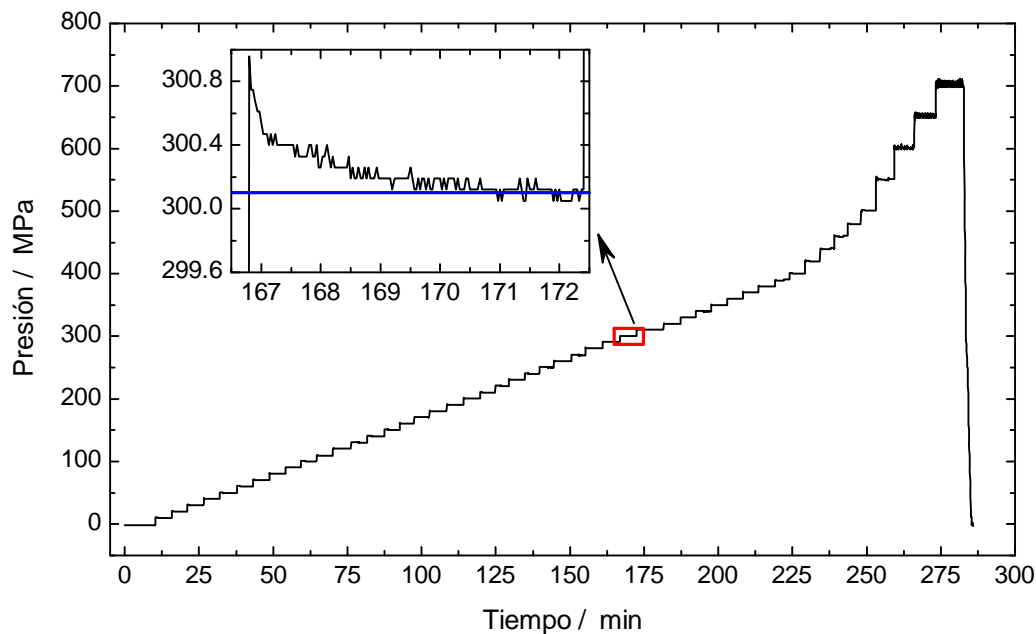
Para determinar la temperatura y la presión a las que se realizaron las medidas, de los datos recogidos por el sistema de adquisición de datos, se toman los valores de dichas magnitudes correspondientes a los últimos cuarenta y cinco segundos de cada ciclo, que es cuando se registra la medida en el osciloscopio. Se hace la media de los valores de presión y temperatura recogidos en esos cuarenta y cinco segundos, calculando así las condiciones medias de presión y temperatura en las que se hicieron las medidas y la desviación estándar de las mismas mencionadas anteriormente.

En un experimento típico, una vez alcanzado el equilibrio a la temperatura y presión deseada, se realiza la medida. La compresión posterior de la muestra al siguiente valor elegido de presión produce un aumento de temperatura de la muestra, cuya magnitud depende del incremento de presión realizado y de las propiedades termofísicas de la muestra estudiada. Esto sucede porque se trata de un proceso adiabático, en el que no hay intercambio de calor con el entorno, y el aumento de presión produce el consiguiente aumento de temperatura. En general, en las disoluciones acuosas medidas, los incrementos de presión de 10 MPa han producido un aumento de unos 0.5 K, en el caso de los incrementos de 50 MPa el aumento de temperatura fue de 1.3 K aproximadamente. A las presiones más altas medidas, con incrementos de 100 MPa, la temperatura ascendió unos 2.2 K.

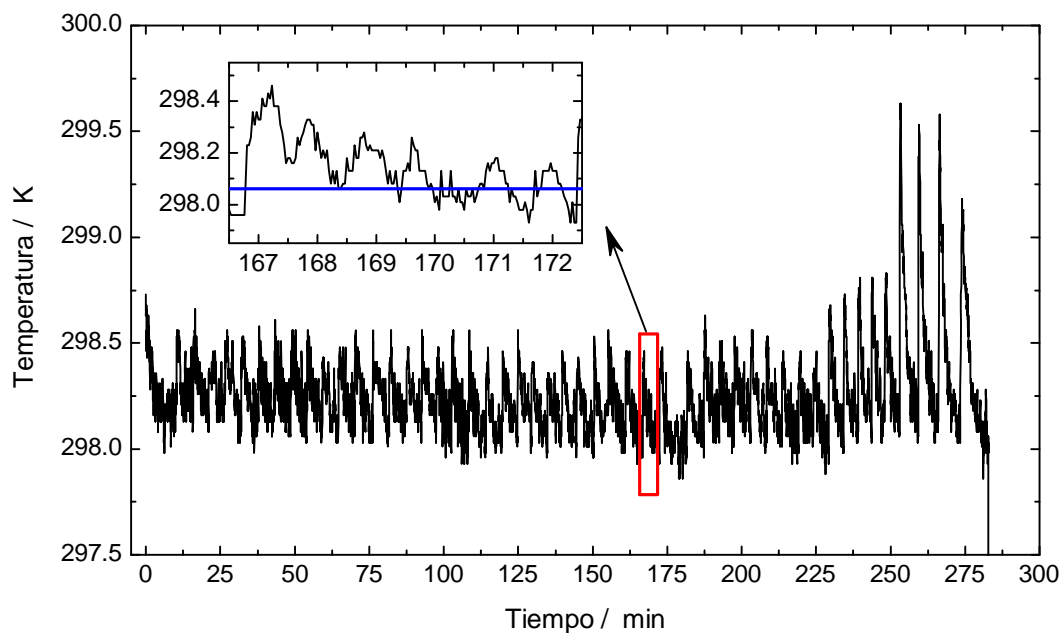
En la Figura 3.17 se ha representado la variación de la presión con el tiempo en un experimento con agua Milli-Q desgasificada en el que se utilizaron distintos pasos de compresión de la muestra. Primero cada 10 MPa hasta 400 MPa, a continuación cada 20 MPa hasta 500 MPa y finalmente cada 50 MPa hasta 700 MPa, como se puede



apreciar en la forma escalonada de la señal. En la Figura 3.18 se ha representado la correspondiente variación de la temperatura en función del tiempo en el interior del cilindro portamuestras para la misma muestra que en la Figura 3.17.



**Figura 3.17.** Evolución con el tiempo de la presión a la que se sometió la muestra en un experimento.



**Figura 3.18.** Evolución con el tiempo de la temperatura en el interior de la celda de medida.

En las figuras insertadas de las Figuras 3.17 y 3.18 se muestra una ampliación de la evolución con el tiempo de la presión y temperatura durante uno de los pasos de compresión. La duración de la medida viene determinada por el tiempo que tarda la muestra en alcanzar la temperatura de equilibrio tras la variación de la presión. Las

líneas azules horizontales representan la presión y la temperatura medias durante los últimos 45 segundos, que es cuando se recoge la señal promediada en el osciloscopio, y que, como ya se ha comentado, se tomarán como los valores efectivos de la presión y la temperatura para cada uno de nuestros datos.

### 3.3.2.2 Medidas de cambio de volumen

Para realizar las medidas de cambio de volumen en función de la presión se llenó el contenedor cilíndrico con alrededor de 17 g de muestra previamente homogeneizada y se tapó con el émbolo, asegurando que no quedara aire atrapado en su interior. Para ello se abrió el tornillo de purga con una llave Allen y se presionó el émbolo para evacuar las pequeñas burbujas de aire que pudieran quedar en el interior. Previamente se dieron unos golpecitos suaves al recipiente para tratar de despegar posibles microburbujas de las paredes. Se cerró el tornillo de purga y el portamuestras se llevó a una balanza de precisión (Boeco, Alemania). Se anotó su masa para el posterior tratamiento de datos (la tara se hizo previamente pesando el portamuestras vacío y el émbolo). El volumen inicial de la muestra se obtiene con la siguiente expresión:

$$V_{ini} = \frac{m}{\rho_0(T)} \quad \text{Ecuación 3.10}$$

donde  $m$  es la masa de la muestra, y  $\rho_0(T)$  es la densidad a presión atmosférica y a la temperatura  $T$  de medida determinada con el densímetro.

El cilindro portamuestras con el émbolo se montó sobre el cabezal de cierre de la vasija de alta presión asegurando que las juntas (una metálica y otra de goma) estuviesen bien colocadas en el cabezal antes de enroscar el portamuestras en él.

A continuación, se preparó el equipo de alta presión mediante un juego de válvulas y ajustando el potenciómetro del que dispone la máquina. Como precaución se aseguró un nivel suficiente de aceite de silicona tanto en el reservorio como en la vasija para evitar la inclusión de aire en el equipo. Se montó todo el dispositivo en la vasija y se recolocaron las válvulas en la posición correcta para la realización de los experimentos. La vasija se sumergió en el baño atemperado a la temperatura de trabajo y se tomaron los datos de las diferentes señales del sistema de adquisición de datos. Los valores de la temperatura de la muestra, la temperatura del baño, el desplazamiento del pistón y la presión se recogieron cada 0.5 segundos.

Una vez se consiguió el equilibrio térmico (proceso que duró entre 20 y 60 minutos), la presión se aumentó hasta la primera presión del experimento, normalmente 50 MPa, a través de los botones de mando y fijando la velocidad de compresión por medio del potenciómetro de la máquina. Al aumentar la presión, se produce un aumento de la temperatura (debido al calor adiabático generado durante la compresión) por lo que fue necesario esperar entre 10 y 15 minutos tras cada presurización para recuperar la temperatura de trabajo y poder obtener las medidas a las otras presiones. En esta tesis la temperatura de trabajo fue de 298.15 K y los incrementos de presión fueron de 20, de 50 o de 100 MPa, dependiendo del experimento, hasta la presión máxima de 700 MPa. Siendo  $\Delta V(p)$  el cambio de volumen total experimentado por la muestra a la presión  $p$ . Con estos datos y el volumen específico de cada sustancia estudiada (dodecanoato de sodio y caseinato de sodio) a presión atmosférica,  $V_0(T)$ , se obtuvieron los valores experimentales del volumen específico de cada sistema a las presiones y temperaturas estudiadas.

Acabada la última medición, se realizó la expansión para recuperar la presión atmosférica y se paró la máquina. Para finalizar el proceso de expansión, se abrieron lentamente las válvulas en el orden estipulado, se sacó el cabezal de la vasija y el portamuestras fue pesado con su tapa para comprobar que no hubiera habido pérdidas de muestra durante el experimento. Después, se abrió el tornillo de purga del portamuestras, se sacó el émbolo, se desechó la muestra y se limpió el material. La duración total del experimento estuvo comprendida entre 3 y 6 horas dependiendo de los diferentes incrementos de presión que se hubiesen llevado a cabo.

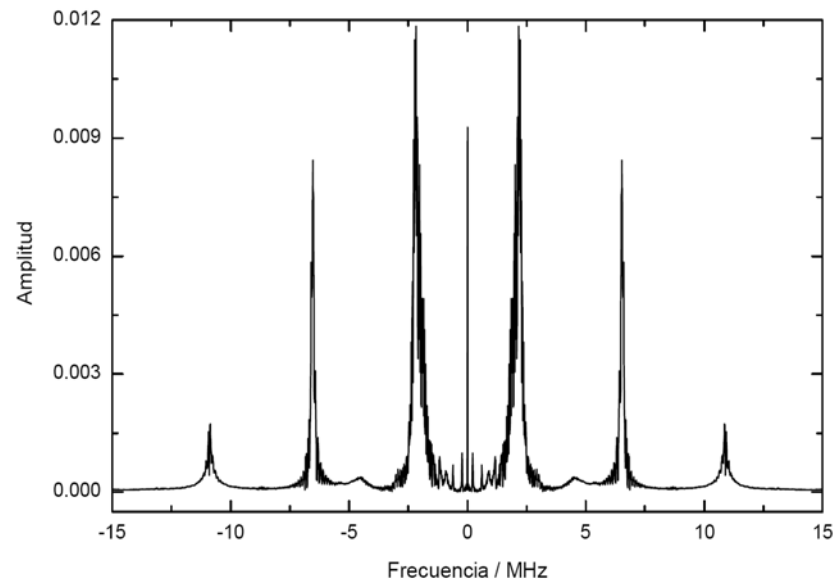
### 3.3.3 Tratamiento de datos experimentales

#### 3.3.3.1 Medidas de velocidad del sonido

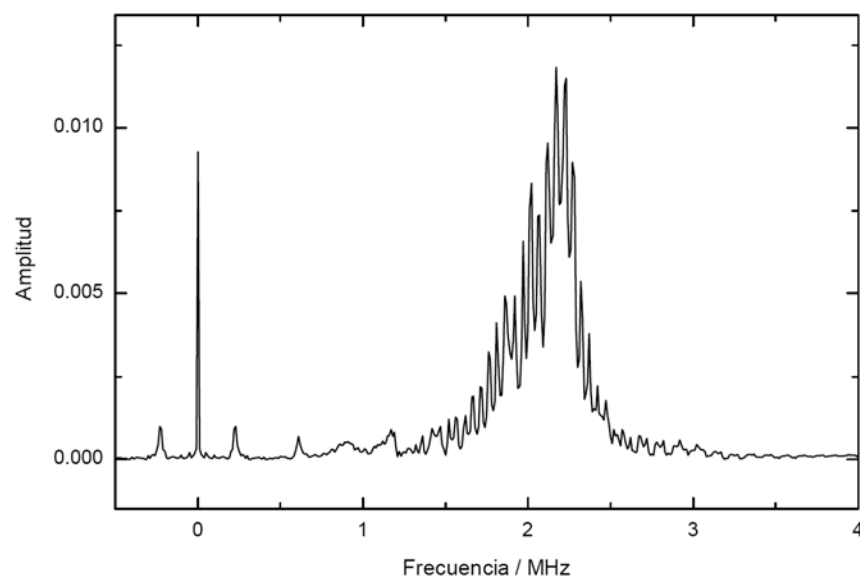
Los datos experimentales de la señal del pulso enviado al piezoeléctrico emisor se miden mediante el osciloscopio descrito anteriormente. Se ha ajustado la resolución de dicho osciloscopio para obtener los datos con la precisión necesaria como para poder determinar la velocidad del sonido con una precisión de  $0.1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Dicha resolución fue de 800 ps, obteniendo un total de 125000 puntos por cada medida.

Los datos recogidos en el osciloscopio son exportados a un ordenador, donde por medio del programa OriginPro® 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA), son tratados con un filtro FFT (Fast Fourier Transform). Mediante el tratamiento de la

señal con esta función matemática se consigue pasar de un dominio de tiempo a un dominio de frecuencia, y fijando un paso de banda de 0 a 3 MHz, se selecciona la frecuencia de resonancia de mayor amplitud, que está en la zona de 2 MHz, que corresponde a la frecuencia de los piezoeléctricos, obteniendo una señal limpia y sin frecuencias de resonancia adicionales. En la Figura 3.19 se muestra el espectro de frecuencias de una de las medidas realizadas: los diferentes picos que se observan se deben a todas las frecuencias que componen la señal.



**Figura 3.19.** Espectro de frecuencias de una señal típica medida con el osciloscopio.

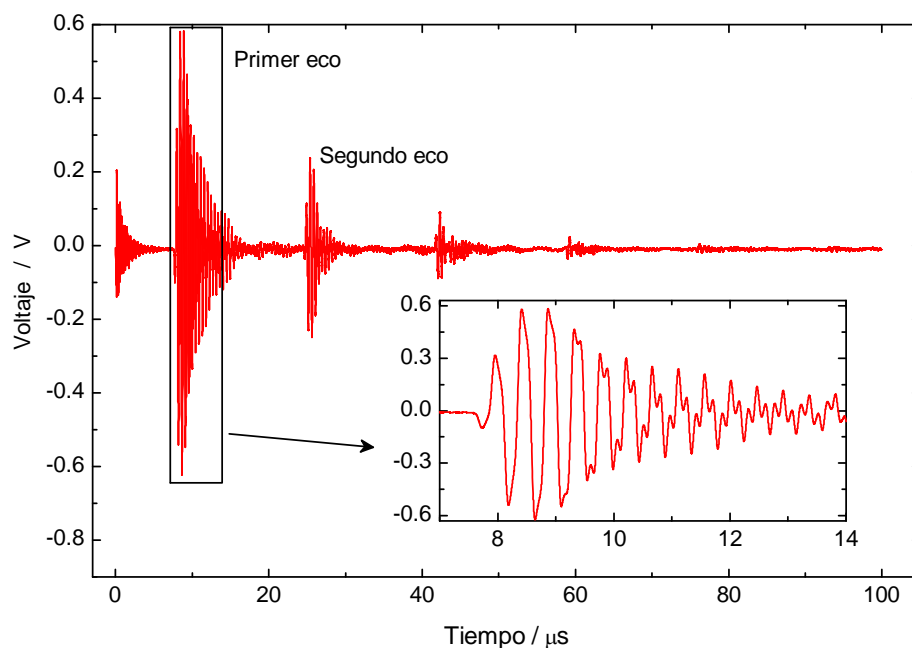


**Figura 3.20.** Ampliación del espectro de frecuencias de la Figura 3.19.

En la ampliación, en la Figura 3.20, se aprecian las frecuencias que van a componer la señal que se va analizar en todas las medidas realizadas. Finalmente,

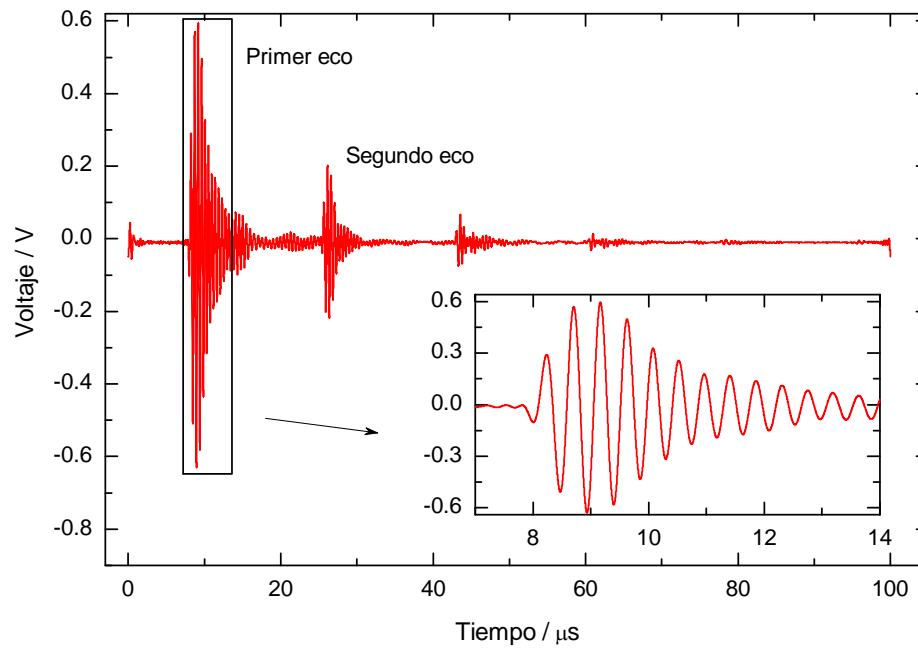
mediante el programa OriginPro® 8.0 se realiza la transformada de Fourier inversa y se vuelve a tener la señal en el dominio de tiempo.

Este tratamiento con la transformada de Fourier es necesario ya que si se trata de obtener información directamente de la señal que se recoge en el osciloscopio nos encontraríamos con un problema, tal y como se muestra en la Figura 3.21, donde se ha representado dicha señal. En la ampliación insertada en esta figura se puede apreciar cómo al no haber sido tratada dicha señal con la transformada de Fourier, hay frecuencias que solapan entre sí, produciendo que no sea una señal limpia, es decir, que no se puede determinar con claridad y precisión suficiente el valor del tiempo en los máximos y mínimos de cada pico.



**Figura 3.21.** Señal del pulso tal y como se obtiene en el osciloscopio. En la figura insertada se muestra una ampliación del primer eco de la señal.

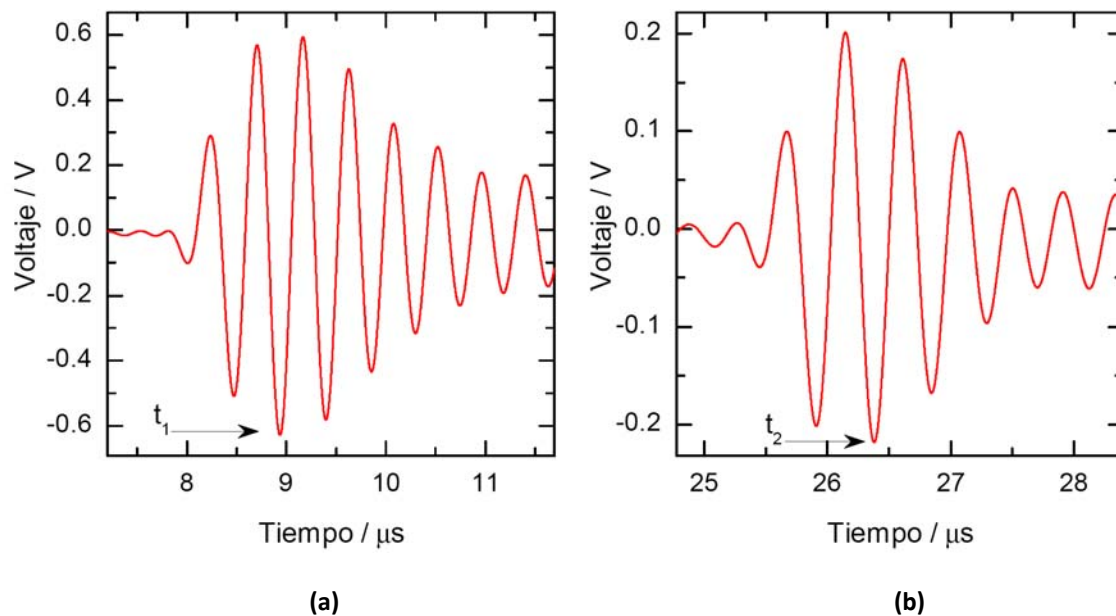
A continuación, en la Figura 3.22, se muestra la misma señal que en la Figura 3.21 tratada con la función FFT como se ha explicado anteriormente. En la ampliación insertada se puede apreciar cómo dicho tratamiento ha eliminado las frecuencias resonantes que se acoplan a la principal, eliminando señales espurias de la señal y pudiendo determinar ahora con claridad y precisión el valor del tiempo en los máximos y mínimos de cada pico.



**Figura 3.22.** Señal del pulso medida mediante el osciloscopio tras ser tratada mediante transformada de Fourier. En la ampliación se aprecia cómo la señal se suaviza mediante el tratamiento matemático.

Una vez que todas las señales medidas se han analizado mediante el tratamiento con transformada de Fourier, el siguiente paso consiste en la determinación del tiempo de vuelo. Para ello, se elige un pico del primer eco, normalmente el más intenso, y se determina el mínimo en dicho pico; posteriormente, se elige el pico homólogo del segundo eco y se vuelve a determinar el tiempo en el mínimo de ese extremo, como se ha esquematizado en la Figura 3.23. Finalmente se calcula la diferencia entre ambos mínimos, obteniendo el tiempo que tarda la onda en ir desde el piezoeléctrico emisor  $E$ , hasta el piezoeléctrico receptor  $R$  y volver, es decir, el tiempo de vuelo,  $\tau$ .

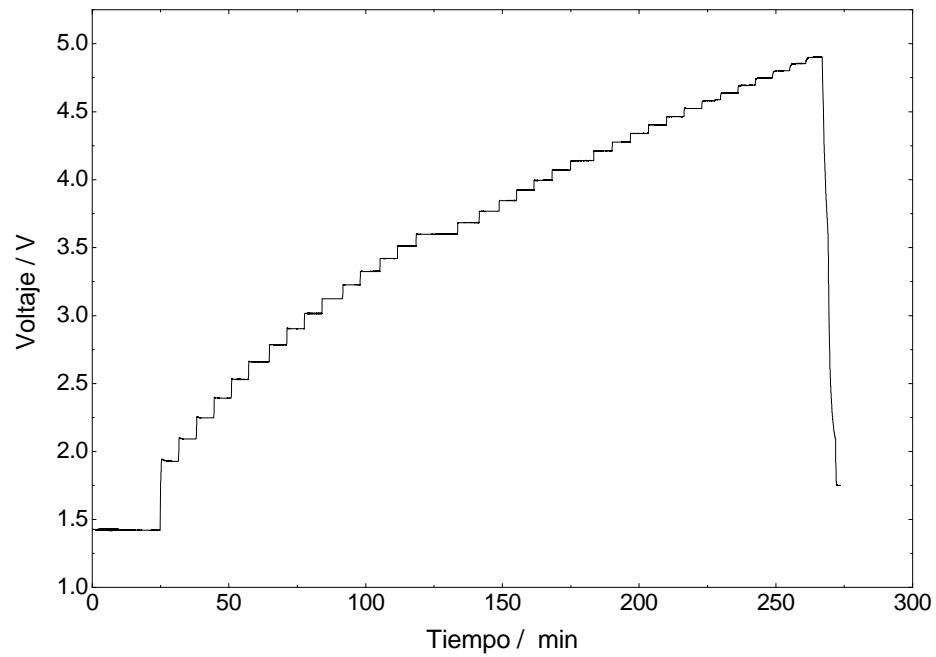
Para determinar la velocidad del sonido a partir de los datos del tiempo de vuelo se debe hacer uso de la Ecuación 3.11 con los datos de  $\tau$  a la presión de medida y  $\tau_{cal}$  correspondiente al calibrado.



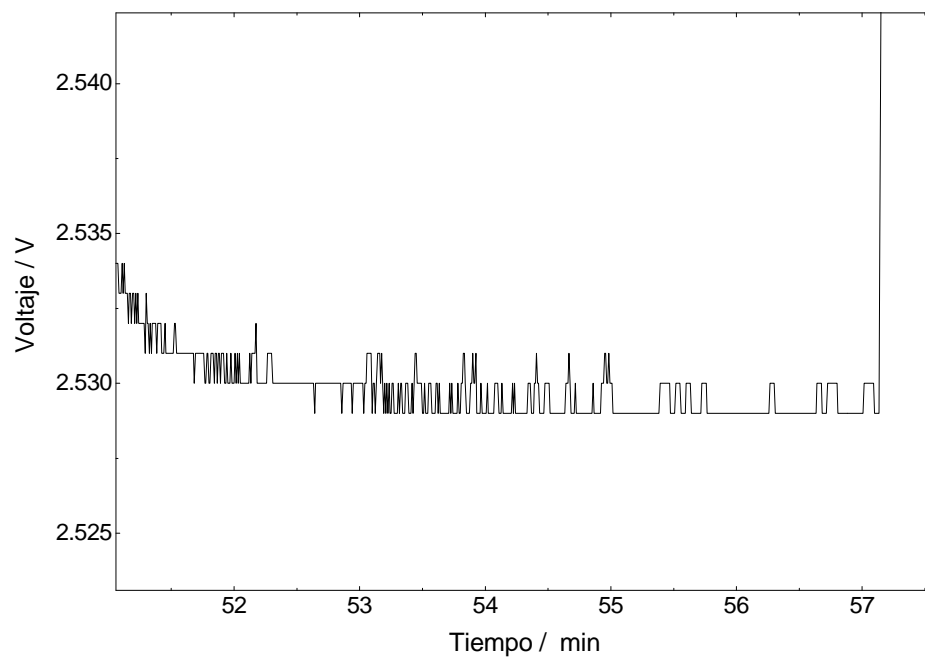
**Figura 3.23.** Elección del pico en el primer (a) y segundo (b) eco en la señal tratada mediante transformada de Fourier de la Figura 3.22.

### 3.3.3.2 Medidas de cambio de volumen

En lo que se refiere al tratamiento de datos de medidas de cambio de volumen y que fueron recogidas por el sistema de adquisición de datos cada 0.5 s, se ha utilizado el software MATLAB® 7.0 (Natick, MA, USA). Este software permite programar rutinas de cálculos. Para ello, se diseñó un programa que tiene en cuenta los parámetros del calibrado realizado previamente. En concreto, se considera la aplicación de las correcciones de calibrado de los termopares y la conversión de los voltajes a presión y cambio de volumen. A continuación se analizaban los datos obtenidos del equipo de alta presión como la presión, la temperatura, o el voltaje producido por el LVDT debido al cambio de volumen en función del tiempo o de la presión. Por último, se seleccionaban los tiempos a los que se debían calcular los promedios de presión, temperatura y volumen. En las Figuras 3.24 y 3.25 se muestra un ejemplo del voltaje determinado por el LVDT en función del tiempo para los diferentes incrementos de presión realizados en un experimento típico.



**Figura 3.24.** Variación del voltaje con el tiempo para un experimento típico de cambio de volumen.



**Figura 3.25.** Ampliación de la Figura 3.24 que muestra los últimos minutos de una medida antes de aumentar de nuevo la presión.

Las medidas del volumen específico deben realizarse cuando la muestra se encuentra en equilibrio térmico, justo antes de aumentar nuevamente la presión. Estas medidas se promediaron durante un minuto para dar el valor final de la temperatura, la presión, y la posición del pistón a cada etapa del experimento; este valor final será el considerado para los cálculos posteriores.



A continuación se introduce el valor del volumen específico de la muestra a 298.15 K a presión atmosférica en el programa MATLAB® y se procede al ajuste del valor inicial del voltaje a partir del cual se van a contabilizar las variaciones de voltajes y, por tanto, de volumen. Finalmente se calculó el volumen específico aparente utilizando la ecuación de estado del agua (formulada por IAPWS-95<sup>16</sup>) para calcular el volumen específico del agua en las mismas condiciones de presión y temperatura en las que se midió el volumen específico de la muestra.

### 3.4 Referencias

- <sup>1</sup> [http://www.anton-paar.com/Medidor-de-densidad-y-de-velocidad-del-sonido-DSA-5000-M/Dens%C3%ADmetros-y-medidores-de-concentraci%C3%B3n/60\\_Mexico\\_es?product\\_id=332](http://www.anton-paar.com/Medidor-de-densidad-y-de-velocidad-del-sonido-DSA-5000-M/Dens%C3%ADmetros-y-medidores-de-concentraci%C3%B3n/60_Mexico_es?product_id=332) Consultado el 1 de octubre de 2012.
- <sup>2</sup> [www.unipress.waw.pl/](http://www.unipress.waw.pl/) Consultado el 1 de octubre de 2012.
- <sup>3</sup> [http://www.boschrexroth.es/country\\_units/europe/spain/es/index.jsp](http://www.boschrexroth.es/country_units/europe/spain/es/index.jsp) Consultado el 1 de octubre de 2012.
- <sup>4</sup> <http://www.brosa.net/26.html?&L=1> Consultado el 1 de octubre de 2012.
- <sup>5</sup> <http://www.peltron.pl/index-ang.html> Consultado el 1 de octubre de 2012.
- <sup>6</sup> <http://www.olympus-ims.com/es/5072pr/> Consultado el día 1 de octubre de 2012.
- <sup>7</sup> <http://www1.tek.com/es/> <http://www.tek.com/datasheet/digital-phosphor-oscilloscopes-5> Consultado el día 1 de octubre de 2012.
- <sup>8</sup> <http://www.ferroperm-piezo.com/> Consultado el día 1 de octubre de 2012.
- <sup>9</sup> <http://www.thermo.com/com/CDA/Cat/CategoryFrames/0,,,00.html> Consultado el día 1 de octubre de 2012.
- <sup>10</sup> <http://www.yokogawa.com/> Consultado el día 1 de octubre de 2012.
- <sup>11</sup> <http://www.ictan.csic.es/ictan/> Consultado el día 1 de octubre de 2012.
- <sup>12</sup> <http://www.testequipmentdepot.com/druck/dry-block/dbc150ts.htm>  
[http://www.ge-mcs.com/download/appnotes/920\\_114a.pdf](http://www.ge-mcs.com/download/appnotes/920_114a.pdf) Consultado el día 1 de octubre de 2012.
- <sup>13</sup> [http://www.sylvac.ch/index.php?option=com\\_virtuemart&page=shop.browse&category\\_id=1&Itemid=0&lang=en](http://www.sylvac.ch/index.php?option=com_virtuemart&page=shop.browse&category_id=1&Itemid=0&lang=en) Consultado el día 1 de octubre de 2012.

- 
- <sup>14</sup> [http://www.testo.es/online/abaxx-?\\$part=PORTAL.ESP.SectorDesk&\\$event=show-from-menu&categoryid=5570532](http://www.testo.es/online/abaxx-?$part=PORTAL.ESP.SectorDesk&$event=show-from-menu&categoryid=5570532) Consultado el día 1 de octubre de 2012.
- <sup>15</sup> <http://www.kgt-hochdrucktechnik.de/> Consultado el día 1 de octubre de 2012.
- <sup>16</sup> Wagner W., Pruß A.; *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2002**, 31(2), 387-535.
- <sup>17</sup> Carvill J.; *Mechanical Engineer's Data Handbook*. Butterworth Heinemann, **1993**.



# ***CAPÍTULO 4***

## ***ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN DEL AGUA A ALTA PRESIÓN MEDIANTE ULTRASONIDOS***

---

Este capítulo está dedicado al estudio de la agregación del agua líquida bajo presión mediante ultrasonidos. Por ello, en la primera sección de introducción se hará un breve repaso acerca de su estructura y propiedades, indicando también algunos aspectos de los estudios previos sobre la velocidad del sonido del agua.

A continuación se comentarán una serie de estudios llevados a cabo en agua relacionados con aspectos estudiados en esta tesis. En concreto, se comentarán estudios realizados mediante simulaciones teóricas con objeto de determinar los valores de presión y temperatura que delimitan, en la región del agua líquida, la transición entre los dos tipos de agua que se discutirán en la tesis. Del mismo modo, se comentarán los aspectos más notables de otros estudios realizados mediante espectroscopía Raman, dispersión Brillouin y compresibilidad. Como se verá en esta sección, existen discrepancias entre los resultados de las diferentes técnicas y las conclusiones obtenidas, puesto que no resulta sencillo hacer un estudio del agua y de sus propiedades a presiones elevadas.

Posteriormente se expondrá el procedimiento experimental llevado a cabo para el estudio del agua líquida mediante la técnica de transmisión de ultrasonidos.

Por último, se presentarán los resultados obtenidos para la velocidad del sonido en agua en un amplio intervalo de presiones y temperaturas que han permitido aportar un buen número de resultados en una región del diagrama de fases del agua apenas estudiada.

## **4.1 Introducción**

El agua es una sustancia estudiada desde tiempos remotos. Ya en el primer milenio antes de nuestra era, el filósofo y matemático griego Tales de Mileto se preguntaba por una sustancia de la que estuvieran formadas el resto de sustancias de la Tierra, es decir, la piedra filosofal. Según su teoría propuesta, esta sustancia no podía ser otra que el agua ya que afirmaba que se transforma en vapor, que atribuía a los elementos aire, nubes y éter (alma); que a partir del agua se formaban los cuerpos sólidos al condensarse y la Tierra flotaba en ella. Para Tales de Mileto no había duda alguna: el agua era la sustancia de la que surgían el resto, puesto que era la que se encontraba en mayor cantidad, rodeaba la Tierra, impregnaba la atmósfera en forma de vapor, corría a través de continentes por los ríos y la vida no era posible sin ella, por lo que sentenció que “el principio de todas las cosas es el agua”.

En los tiempos de la ciencia moderna, el agua ha sido, quizás, la sustancia que ha despertado mayor interés y en la que se han invertido más esfuerzos en su estudio por la comunidad científica. Esto se debe, en primer lugar, a que es la sustancia más abundante en la superficie del Planeta y es indispensable para el origen de la vida tal y como la conocemos. En segundo lugar, el agua muestra una fascinante variedad de anomalías en sus propiedades, como se verá posteriormente, tanto en su estado puro como cuando actúa como disolvente. Muchas de esas anomalías ocurren en condiciones de presión y temperatura diferentes a las ambientales, por lo que han sido objeto de estudio por una parte de la comunidad científica.

### **4.1.1 La molécula de agua**

La estructura de la molécula de agua es bien conocida: está formada por un átomo altamente electronegativo, el oxígeno, que está unido a otros dos átomos de hidrógeno débilmente electronegativos. Esta diferencia de electronegatividad le confiere a la molécula de agua una alta polaridad que hace que pueda formar enlaces de hidrógeno a través de los átomos de hidrógeno cargados positivamente, o bien, a

través del átomo de oxígeno cargado negativamente, es decir, que es capaz de formar fuertes interacciones electrostáticas.

Con dos moléculas de agua, la atracción intermolecular entre el átomo de hidrógeno de una molécula de agua y el par de electrones de otra molécula de agua hace que se forme un enlace de hidrógeno, formándose un dímero de agua como el que aparece en la Figura 4.1.

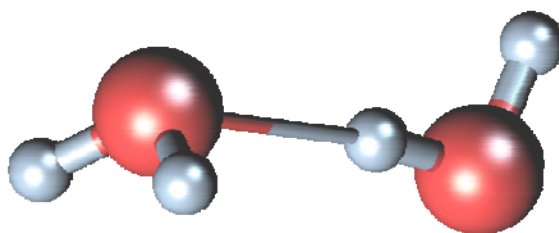
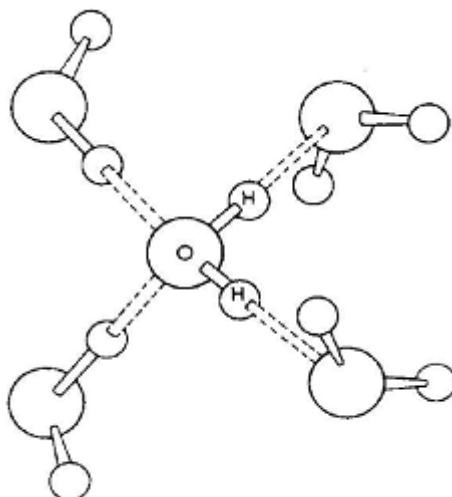


Figura 4.1. Dímero de agua.

Estos dímeros existen en la fase gas y su existencia fue puesta en evidencia por primera vez por Dyke y colaboradores.<sup>1,2</sup> Sus experimentos mediante resonancia mostraron que la configuración de menor energía tiene un plano de simetría que contiene el hidrógeno donador de la molécula a la derecha y el eje de simetría de la molécula a la izquierda. La distancia de enlace medida en el dímero de agua fue de 2.98 Å, que es significativamente mayor que las observadas en el agua líquida y en el hielo (en torno a 2.85 y 2.74 Å, respectivamente). La reducción de la distancia O...O en las redes con fuerte presencia de enlaces de hidrógeno se puede atribuir a la naturaleza cooperativa del enlace de hidrógeno.

- **Estructuras tetraédricas**

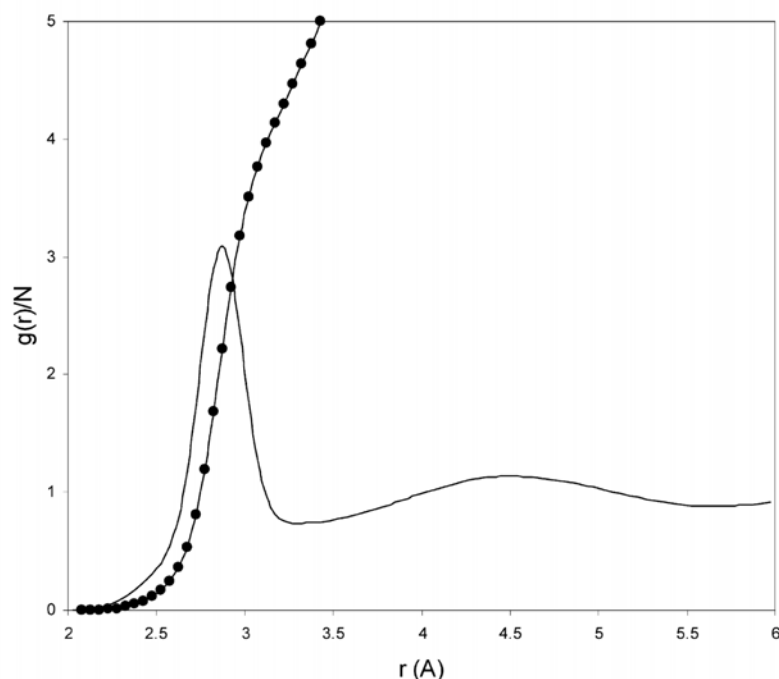
Debido a la disposición tetraédrica de los grupos enlazantes en una molécula simple resulta la posibilidad de que la molécula forme únicamente cuatro enlaces de hidrógeno con las moléculas vecinas, como se muestra en la Figura 4.2. En el llamado pentámero de Walrafen,<sup>3</sup> los dos átomos de hidrógeno de la molécula central actúan como aceptores y los dos pares sin compartir como donadores. Es posible rellenar el espacio tridimensional con unidades de coordinación tetraédricas, como ocurre en el caso del hielo I<sub>h</sub>, forma de agua congelada a presión atmosférica, así como en los clatratos. Esta posibilidad indica que, tanto las propiedades microscópicas como macroscópicas del agua, se derivan del hecho de que el agua está formada por una red tridimensional de tetraedros unidos por enlaces de hidrógeno.



**Figura 4.2.** Configuración tetraédrica de las moléculas de agua formada por dos enlaces covalentes y dos pares de electrones sin compartir en la molécula central.

#### 4.1.2 Estructura del agua líquida

Uno de los grandes avances para conocer la estructura del agua líquida fue la determinación mediante rayos X y difracción de neutrones, de las distribuciones radiales ( $g(r)$ ) de los enlaces O-O, H-H y O-H.<sup>4,5,6</sup> Sorprendentemente, estos experimentos demostraron que gran parte de la red tetraédrica que presenta el hielo  $I_h$ , persiste en el agua líquida. A partir de la función de distribución radial oxígeno-oxígeno,  $g_{OO}(r)$ , representada en la Figura 4.3, se observa, con la presencia de un máximo en la densidad de distribución a 2.8-2.9 Å, que la distancia a la que se encuentran los átomos vecinos más cercanos, es apenas un poco mayor que en el hielo  $I_h$ . Aparece también, aunque muy ancho, un pico de densidad a unos 4.5 Å que indica el ordenamiento tetraédrico entre moléculas de agua en la primera capa de coordinación. Las funciones de distribución radial muestran, no obstante, grandes diferencias entre el hielo y el agua líquida. El índice de coordinación queda definido por el primer pico de la integral de  $g_{OO}(r)$  que está situado alrededor de 4.5-4.7 Å, y es significativamente mayor que en el hielo,<sup>7</sup> aunque todavía bajo comparado con otros líquidos. Por ejemplo, una molécula pequeña líquida de naturaleza orgánica tiene un índice de coordinación entre 6 y 10. Por tanto, el agua, al igual que el hielo, presenta una estructura abierta con un alto grado de ordenamiento angular. Sin embargo, en el líquido hay una cantidad considerable de densidad que se extiende entre las posiciones del hielo de la primera y segunda capa de coordinación (a 2.75 y 4.5 Å respectivamente).

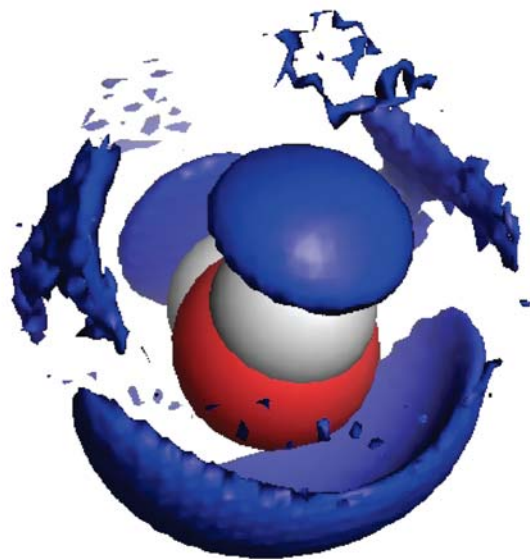


**Figura 4.3.** La línea continua representa la función de distribución radial  $g_{oo}(r)$ . (●) Moléculas de agua integradas a 298.15 K y 1 atm. Figura tomada de la Ref. [8].

- **Estructura angular**

La estructura angular del agua líquida se puede obtener sólo indirectamente mediante técnicas de dispersión y espectroscópicas y, a veces, con ayuda de simulaciones. Existen diferentes formas de caracterizar la estructura angular, por ejemplo, las medidas del carácter tetraédrico derivadas a partir de las posiciones del triplete.<sup>9</sup> Estos experimentos se han utilizado con buenos resultados para caracterizar las anomalías estructurales del agua pura en un amplio intervalo de temperaturas y presiones,<sup>10</sup> pero son bastante insensibles a los efectos del soluto. Aunque el agua alrededor de grupos apolares se vuelve más ordenada, como muestra el valor negativo de la entropía de solvatación, realmente se observan pocas diferencias en la geometría tetraédrica.<sup>9</sup> Una medida del carácter tetraédrico, basada en las distancias en lugar de en los ángulos,<sup>11</sup> ha mostrado diferencias en la estructura del agua inducidas por proteínas cuando se observa un ciclo de histéresis producida por la temperatura.<sup>12</sup> Por otro lado, la función de densidad espacial mide la densidad relativa de las moléculas de agua en torno a una molécula de agua central orientada en una zona acotada de referencia, es decir, es la distribución local de densidad en función de la distancia y la coordenada polar,  $g(r, \phi, \theta)$ .<sup>13,14</sup> En la Figura 4.4 se muestra esta función en condiciones ambientales obtenida en las Refs. [13,14].





**Figura 4.4.** Función de posición espacial  $g(r, \phi, \theta)$  del agua líquida a 298.15 K y 1 atm simulada con el modelo TIP3P para el agua.<sup>13,14</sup>

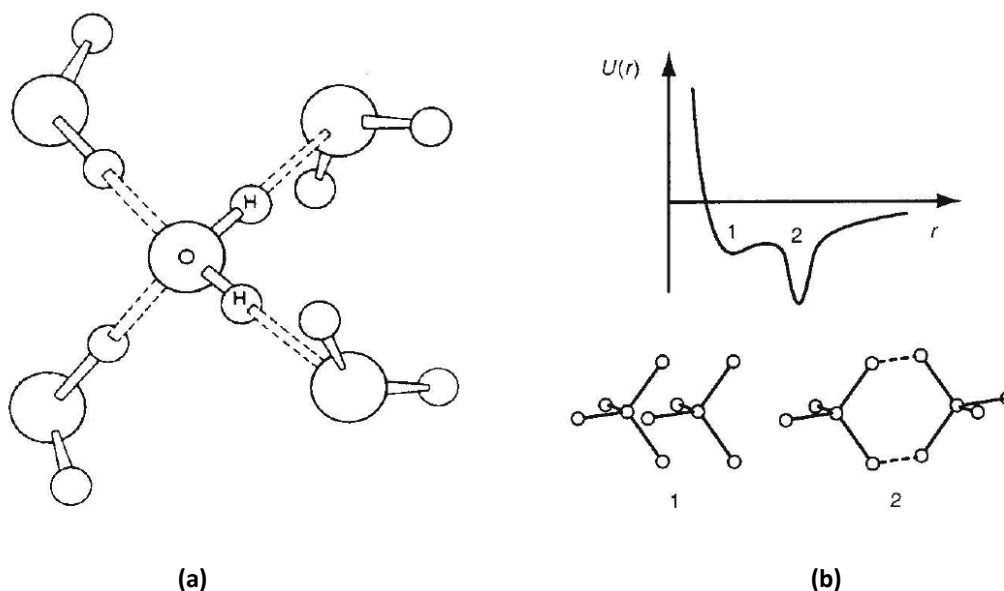
Tanto las simulaciones como los trabajos experimentales sobre el estudio de la estructura angular del agua muestran un excelente acuerdo, encontrándose que las características más importantes que se pueden destacar son, en primer lugar, que la orientación de los dos enlaces de hidrógeno aceptores en la primera capa de coordinación están mucho mejor definidos que los de los dos o más, si es que los hubiere, enlaces de hidrógeno donadores.<sup>13,14,15</sup> En segundo lugar, se observa que existe una cantidad significativa de agua albergada intersticialmente en la primera capa de coordinación, aproximadamente a 3.2-3.8 Å, pero significativamente más cerca que la segunda capa, que está situada a 4.5 Å.<sup>14,15</sup>

- **Pentámero de Walrafen**

Por otro lado, mediante estudios de espectroscopía Raman, difracción de neutrones y rayos X, se dedujo la existencia del ya mencionado pentámero de Walrafen.<sup>3</sup>

El análisis de las posibles interacciones efectivas entre estos pentámeros lleva a suponer que, con el cambio de presión, pueden encontrarse en dos configuraciones extremas. A bajas presiones dos pentámeros interactúan a través de estados triplemente ligados (configuración 2 en la Figura 4.5.b), mientras que a altas presiones se minimiza la energía en una configuración interpenetrada sin estados ligados (configuración 1 de la Figura 4.5.b). Esto llevó a pensar en la existencia de un posible potencia de interacción entre los pentámeros compuesto por dos mínimos, correspondientes a cada configuración típica.<sup>16</sup> Como se muestra en la Figura 4.5.b, en

este potencial existen dos distancias típicas de interacción donde la situación más favorable de mínima energía corresponde a la configuración 2, típica de las condiciones de baja presión.



**Figura 4.5. (a)** Pentámero de Walrafen. Unidad estructural básica introducida para explicar distintos resultados de espectroscopía Raman. Los enlaces punteados indican un enlace de hidrógeno. **(b)** Interacción entre dos pentámeros de Walrafen. Las dos posiciones relativas de interacción, 1 y 2, son tomadas como referencia para construir la curva de potencial.

### • Modelos

La importancia y peculiaridad del agua ha inspirado a numerosos científicos durante más de un siglo para desarrollar modelos que reproduzcan el comportamiento observado en el líquido. El primer intento data de 1892 llevado a cabo por Röntgen. En este estudio se explicó el máximo de la densidad como resultado de un cambio del estado de equilibrio entre pequeños cristales de hielo suspendidos en un líquido de moléculas individuales disociadas.<sup>17</sup> El concepto de Röntgen estaba basado en la idea de que el agua líquida puede ser modelizada a nivel local como una mezcla de dos estructuras: una menos densa y otra más densa. Esto representa, por tanto, el principio de una familia que se ha llamado “modelos de mezcla” para las estructuras líquidas.<sup>18</sup> Estos modelos se centran en las estructuras del enlace de hidrógeno del líquido y distingue entre una población de enlaces de hidrógeno “intactos” y “rotos”. Experimentos de espectroscopía infrarroja en agua líquida mostraron más coincidencias sobre este punto de vista.<sup>19</sup> Se observó un sobretono correspondiente a la tensión O-H con dos componentes bien diferenciadas en la región de 1.4 a 1.6  $\mu\text{m}$ . El valor de la absorbancia de la componente de menor longitud de onda disminuye al

disminuir la temperatura, mientras que la de mayor longitud de onda aumenta. Este comportamiento se asoció con la esperada disminución de la población de enlaces de hidrógeno “rotos” puesto que el líquido se enfría. Aunque es cierto que para otras explicaciones no se requiere el concepto de dos estados de enlace diferentes, estos resultados experimentales animaron a varios científicos a continuar con la idea de las estructuras formadas mediante enlaces “intactos” y “rotos” para modelizar las propiedades del agua líquida.<sup>20,21,22</sup>

Stanley y Teixeira<sup>23</sup> presentaron un modelo más moderno en la misma línea. Su modelo estadístico no requería que las moléculas de agua estuvieran estrictamente enlazadas o no mediante enlaces de hidrógeno; este modelo simplemente describe el grado de conectividad que se observa en una malla de puntos tetracoordinados cuando una fracción al azar de los vecinos más próximos se consideran enlazados, y el resto se consideran no enlazados. Los dos grupos de moléculas de agua interactuantes se distinguen, por ejemplo, por un criterio energético. Las anomalías termodinámicas del agua se podían explicar considerando aquellos agregados tetracoordinados asociados con las regiones de mayor volumen molecular, menor energía y mayor orden.

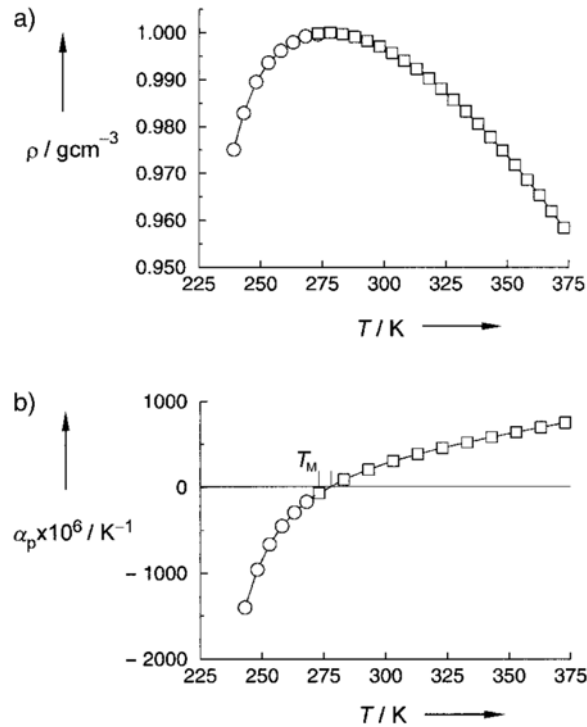
Por otro lado, a lo largo de los últimos años, han prevalecido dos ideas contrapuestas respecto a la naturaleza del enlace de hidrógeno del agua. La primera afirma que el agua es una mezcla de dos (o más) estados diferenciados, que data de los modelos de cluster e iceberg.<sup>24,25</sup> La distribución bimodal de las energías de interacción del agua observadas por medio de las primeras simulaciones realizadas por Rahman y Stillinger<sup>7</sup> se han considerado como una confirmación de este hecho. Pero actualmente, la teoría más ampliamente aceptada es la que afirma que el agua contiene una mezcla de enlaces de hidrógeno que se rompen y forman continuamente, por lo que se ha abierto un debate en la comunidad científica sobre el número de enlaces de hidrógeno que tiene una molécula de agua en estado líquido. Si nos basamos en el mayor número de coordinación que presenta el agua líquida, y en colapso parcial de la estructura abierta del hielo, muchos científicos aseguran que una molécula de agua debe estar formada al menos por cuatro enlaces de hidrógeno con el hielo  $I_h$ , o puede que incluso más. Los experimentos mediante espectroscopía de rayos X de absorción (XAS) se han interpretado por Wernet y colaboradores, con ayuda de las simulaciones teóricas, y vienen a decir todo lo contrario: que el agua está formada por menos enlaces de hidrógeno que el hielo, tan solo dos.<sup>26</sup> Este resultado, totalmente opuesto, ha sido cuestionado por Smith y colaboradores, basado en nuevos experimentos adicionales de XAS.<sup>27</sup>

Dados los resultados del análisis del ángulo del enlace de hidrógeno con los que se cuenta en la bibliografía, la distribución bimodal de los ángulos del enlace de hidrógeno y el hecho de que la temperatura y los solutos modifican las cantidades relativas pero no las posiciones de las poblaciones de los ángulos del agua, resulta atrevido hablar de dos estados del agua. Respecto a este asunto, caben destacar ciertos aspectos: en primer lugar, el análisis del ángulo de enlace no muestra dos estados para el agua en el líquido puro. Hay un promedio de un tipo de agua, que mezcla simultáneamente a los enlaces de hidrógeno de alto y bajo ángulo. Hay, tal vez, una mezcla de dos interacciones, pero no de dos estados del agua. En segundo lugar, el análisis se basa en distribuciones continuas, y no hay, a priori, definiciones de lo que es un enlace de hidrógeno. El comportamiento bimodal emerge de este análisis, pero es mejor ver el agua líquida como una red de enlaces de hidrógeno que se deforman continuamente.

#### 4.1.3 Anomalías en el comportamiento del agua

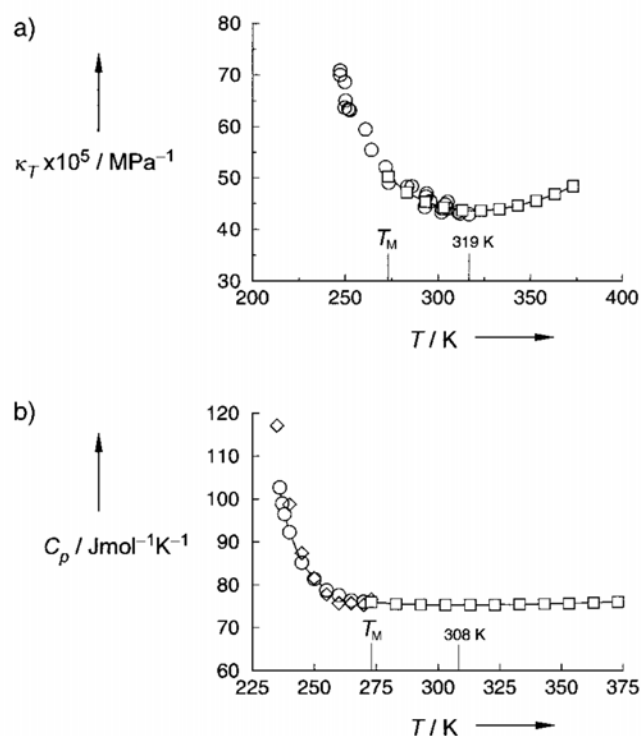
El comportamiento del agua no ha dejado de sorprender a medida que se ha ido conociendo su estructura con el paso de los años, puesto que se desvía del comportamiento típico y presenta características especiales a las de otros líquidos. Quizás, la variación de la densidad con la temperatura, y que ésta presente un máximo en la fase líquida, es la anomalía más destacada.

La densidad del agua a presión ambiente aumenta a medida que se enfría hasta 277.15 K, temperatura a la cual presenta un máximo con un valor de  $0.999972 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Como se muestra en la Figura 4.6.a, la densidad decrece rápidamente por debajo de 277.15 K, tendencia que continua si la densidad del líquido es seguida a través de la región del líquido subenfriado por debajo del punto de congelación del agua a 273.15 K.<sup>28,29,30</sup> Aunque el agua no es el único líquido que presenta un máximo en la densidad, este fenómeno sólo aparece en algunos otros líquidos como el  $\text{SiO}_2$ <sup>31</sup> y el  $\text{Ga}$ <sup>32</sup> fundidos. El agua también presenta un valor negativo para el cambio de volumen en la transición de fase agua – hielo  $I_h$ . La densidad de la mayoría de los líquidos aumenta a medida que se acercan a la solidificación, en cambio, el agua se expande alrededor de un 11 % al producirse la transición de fase a hielo  $I_h$  a presión atmosférica. Este es el fenómeno que permite que el hielo flote en agua líquida. Ambos efectos, el máximo de densidad y el valor negativo del cambio de volumen es lo que provoca que los lagos y los ríos se congelen de arriba hacia abajo.



**Figura 4.6. (a)** Variación de la densidad a presión atmosférica con la temperatura. **(b)** Variación del coeficiente de expansividad térmica a presión atmosférica con la temperatura. Figuras tomadas de las Refs. [29,30,33].

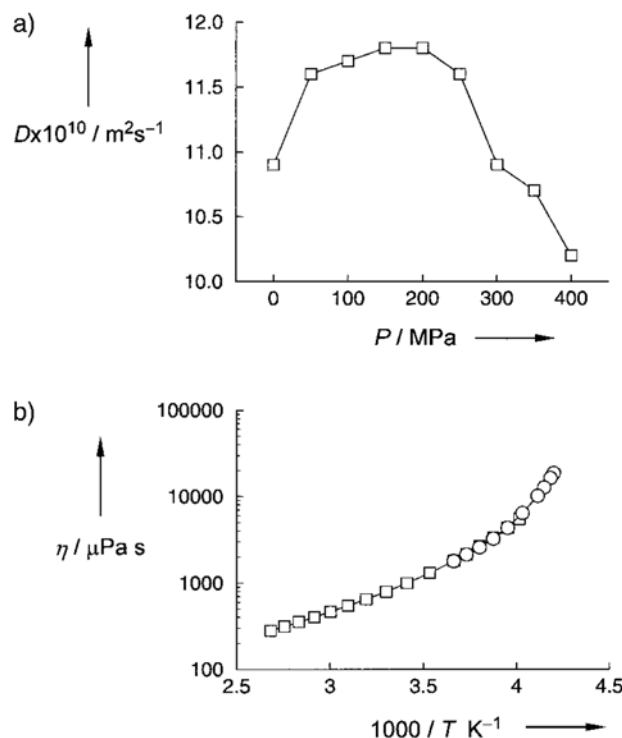
La compresibilidad isoterma  $\kappa_T$ <sup>34</sup> del agua a presión atmosférica pasa a través de un mínimo a una temperatura cercana a la ambiente, a 319.15 K. A menores temperaturas aumenta rápidamente a medida que la temperatura disminuye, y este hecho se ve más acusado en la región del líquido subenfriado como se aprecia en la Figura 4.7.a. Observamos el mismo comportamiento para la capacidad calorífica a presión constante,  $C_p$ <sup>35,36</sup>. Como se muestra en la Figura 4.7.b,  $C_p$  presenta un mínimo a unos 308.15 K. El superenfriamiento produce un fuerte incremento en la capacidad calorífica, esto implica que es necesario aplicar una cantidad de calor mayor para alcanzar una temperatura dada en el agua que para otras muchas sustancias.



**Figura 4.7. (a)** Variación del coeficiente de compresibilidad isoterma  $\kappa_T$  y **(b)** de la capacidad calorífica a presión constante,  $C_p$ , con la temperatura a presión atmosférica. Figuras tomadas de las Refs. [32,34,35].

Las propiedades dinámicas del agua también muestran fuertes anomalías comparadas con el comportamiento de un líquido simple. El coeficiente de difusión  $D$ , normalmente disminuye con el aumento de presión a temperatura constante y, de nuevo, el agua líquida muestra un comportamiento inverso. Como se muestra en la Figura 4.8, el coeficiente de difusión aumenta al aumentar la presión hasta alrededor de 200 MPa y, por encima de esa presión, se observa el decrecimiento característico en  $D$ .<sup>37</sup> El agua fría se vuelve más fluida cuando se comprime, mientras que la mayoría de los líquidos se vuelven más viscosos con la presión. La variación con la presión y la temperatura de otras propiedades de transporte, como la viscosidad,  $\eta$ , también presenta un comportamiento anómalo.<sup>14,38</sup>

La Figura 4.8.b muestra la variación de la viscosidad con el inverso de la temperatura a presión atmosférica. La desviación de los datos respecto de una línea recta indica que la energía de activación  $E_A$  para el movimiento de las moléculas aumenta cuando disminuye la temperatura, lo cual indica que hay un cambio en el mecanismo de movilidad molecular.<sup>39</sup> Otras muchas propiedades dinámicas de la fase líquida, como el tiempo de relajación dieléctrico<sup>40</sup> y el tiempo de relajación nuclear de espín,<sup>41</sup> muestran el mismo tipo de desviación respecto del comportamiento de un líquido simple.

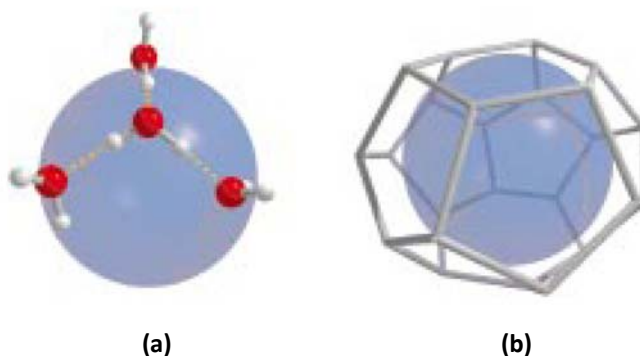


**Figura 4.8. (a)** Variación con la presión del coeficiente de difusión  $D$  a 273.15 K. **(b)** Variación de la viscosidad  $\eta$  con el inverso de la temperatura a presión atmosférica. Figuras tomadas de las Refs. [36,37,38].

Otra de las características del agua que más han llamado la atención es su orientación preferencial en la capa de hidratación de solutos no polares y grupos laterales no polares asociados a biopolímeros. La estructura adoptada por el agua que está próxima a los solutos no polares se ha convertido en una de las principales características de las nuevas teorías de hidratación hidrofóbica y efectos hidrofóbicos, que actualmente tienen gran importancia para entender muchos procesos químicos y biológicos.<sup>42</sup>

La introducción de una molécula de soluto en agua líquida produce un reordenamiento al azar de la red de enlaces de hidrógeno. Además de hacer espacio para albergar la molécula de soluto, el agua trata de reforzar su red alrededor del soluto no polar. Esto se consigue con mejores resultados si se colocan sus enlaces dirigidos hacia los vértices de un tetraedro rodeando a la molécula de soluto como se muestra en la Figura 4.9.a. La molécula de agua se alinea con la dirección de tres tetraedros tangencialmente a la superficie del espacio ocupado con objeto de mantener el mayor número de enlaces de hidrógeno posibles. Esta restricción en la orientación conduce a una contribución negativa de la entropía del proceso de disolución. Un caso extremo se puede observar en la estructura que presentan los clatratos, estructuras

formadas por hielo que albergan gases encerrados en su interior (véase la Figura 4.9.b), donde se muestra que estos reordenamientos son posibles.



**Figura 4.9.** (a) Moléculas de agua junto a un soluto no polar. Cada molécula de agua tiende a dirigir sus enlaces en la dirección de un tetraedro rodeando a la molécula de soluto. (b) Un posible reordenamiento completo de la red de enlaces de hidrógeno podría ser la estructura de los clatratos.

#### 4.1.4 Estructura y propiedades del agua líquida a alta presión: Estudios previos

Como hemos visto, a lo largo de los últimos años numerosos grupos de investigación han dedicado tiempo y esfuerzo al estudio del agua: estructura, propiedades, etc. Hasta el momento, nos hemos centrado en esta introducción en hacer un resumen de los aspectos más destacados del agua a presión atmosférica. En este apartado, se comentarán brevemente algunos de los estudios más relevantes que aparecen en la bibliografía sobre el agua a alta presión. Desde hace unos años se ha observado que bajo presión existen dos formas estructurales del agua distinguibles en la zona de metaestabilidad del líquido: el agua de baja densidad o *low density water* (LDW) y el agua de alta densidad o *high density water* (HDW).<sup>43</sup> A continuación, destacaremos las evidencias de su existencia a partir de diferentes técnicas: simulaciones teóricas, espectroscopía Raman, dispersión Brillouin y compresibilidad.

- **Simulaciones teóricas**

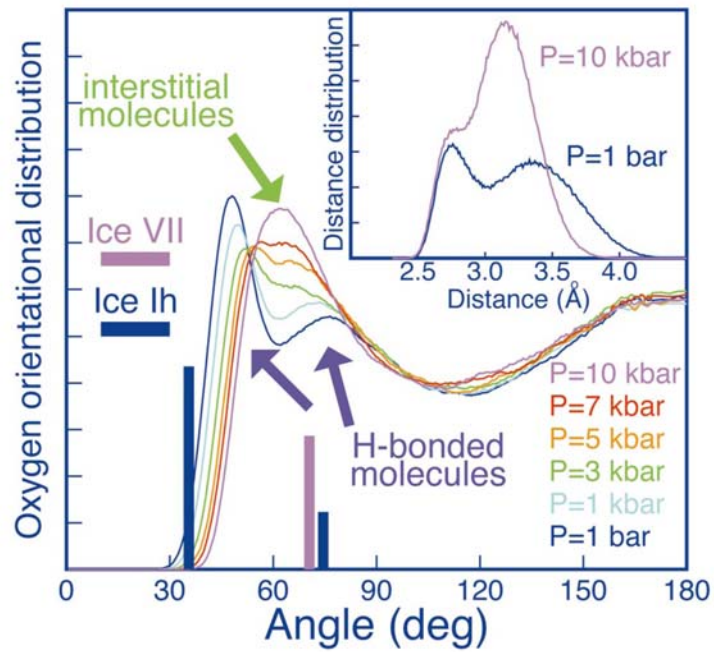
Uno de los estudios llevados a cabo mediante simulaciones teóricas que presenta resultados más interesantes es el realizado por Saitta y Datchi.<sup>44</sup> En él se estudia la estructura y el diagrama de fases del agua de alta densidad haciendo hincapié en el papel de las moléculas intersticiales. Estos autores realizaron cálculos de dinámica molecular de 0 a 1.5 GPa y de 240.15 a 500.15 K en sistemas que contienen 108, 216 ó 512 moléculas de agua y con tiempos de simulación de 0.2 a 1 ns, utilizando un modelo TIP4P.<sup>45</sup> Mediante el cálculo de las funciones de distribución (*pair*



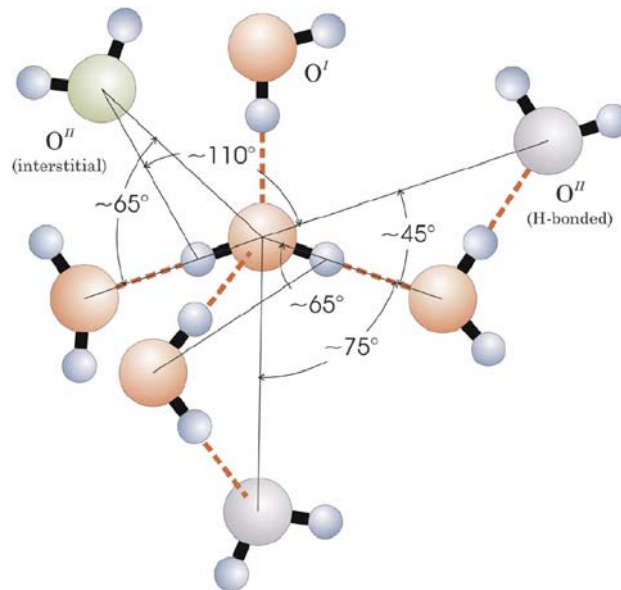
*distribution functions (PDF)*), y las correspondientes funciones para  $g_{OO}(r)$ ,  $g_{OH}(r)$  y  $g_{HH}(r)$  obtienen buenos resultados comparados con los experimentales<sup>46</sup> en condiciones normales, así como con los resultados existentes a alta presión.<sup>47</sup>

En cuanto al cálculo del índice de coordinación, obtienen un valor próximo a cuatro, lo que confirma la geometría tetraédrica que hemos visto en los apartados previos de este capítulo. En lo que se refiere al efecto de la presión, la distribución de las distancias oxígeno-oxígeno para una molécula dada a 300.15 K muestra que la primera capa (formada por los primeros cuatro vecinos) apenas se ve afectada por la presión, en cambio, la segunda capa, (vecinos 5 – 16), sí presenta variaciones: de un único pico a 4.3 Å a presión atmosférica, se pasa a 2 picos a altas presiones, lo que sugiere un reordenamiento debido a la presión, observando a 1 GPa el máximo situado a 3.2 Å. En cambio, la distribución de ángulos O (primera capa) – O – O (primera capa) que es de 105° a presión ambiente, apenas se modifica con la presión.

En la Figura 4.10 se muestra la distribución de ángulos O (primera capa) – O – (segunda capa), observándose dos picos a unos 45° y 75° a presión atmosférica. Como se muestra en la Figura 4.11, el primer pico se debe a la segunda capa de moléculas unidas por enlace de hidrógeno a un átomo de oxígeno de la primera capa, mientras que el segundo pico se debe a las moléculas unidas por enlace de hidrógeno a uno de los otros tres átomos de hidrógeno que son primeros vecinos de la primera capa de la molécula central. Cuando la presión aumenta, los dos picos se funden en uno sólo a unos 65°. Este cambio es sólo aparente y no corresponde a deformaciones continuas en la geometría local y, por tanto, a un colapso de la segunda capa de coordinación. Realmente lo que está ocurriendo es que, a altas presiones, otra segunda capa de moléculas está más cerca de la central que la denominada segunda capa de moléculas a presión atmosférica, es decir, que los resultados muestran que aunque la transformación de LDW a HDW es continua, no se debe a un colapso de la segunda capa sobre la primera, puesto que estas moléculas de la segunda capa en el régimen de alta densidad (HDW) no están unidas por enlace de hidrógeno como las análogas de baja densidad, sino que son puramente intersticiales. El papel de estas moléculas intersticiales, cuya importancia se ha demostrado experimentalmente,<sup>48</sup> se apoya en el estudio de la distancia entre los oxígenos que forman una cara tetraédrica.



**Figura 4.10.** Distribución de los ángulos de O (primera capa, vecinos 1 – 4) – O – (segunda capa, vecinos 5 – 8) a 300.15 K y presiones de 0.1 a 1 GPa. Figura tomada de la Ref. [44].

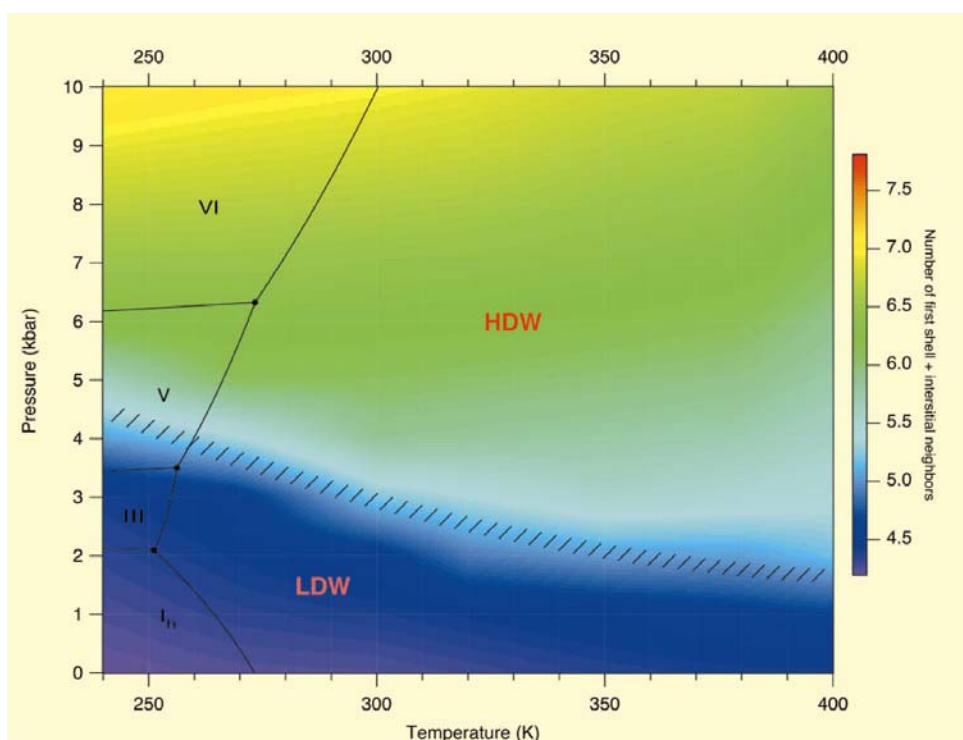


**Figura 4.11.** Geometría esquemática de las moléculas de agua intersticiales y las unidas por enlace de hidrógeno. Molécula central rodeada por 4 primeros vecinos en la configuración tetraédrica. En la parte de la derecha del esquema se describe la estructura del agua en el régimen LDW. En la parte superior izquierda el esquema representaría el régimen HDW. Figura tomada de la Ref. [44].

Con estos resultados los autores consideraron que el régimen de alta densidad para el agua líquida está por encima de 290 MPa y 300.15 K como se muestra en la Figura 4.12. Esta presión aumenta a temperaturas menores, hasta 460 MPa a 240.15 K.

En el intervalo de temperatura de metaestabilidad de la fase líquida, no hay una transición de fase en sentido termodinámico entre estas dos formas del agua, sino que concluyen que se transforman continuamente de una a otra.

En cuanto a la geometría estructural del HDW, ésta se ha descrito localmente como muy similar a la del hielo VI o hielo VII, ambas, con una red de tetraedros interpenetrados,<sup>49</sup> lo que sugiere que la estructura del agua de alta densidad, con las moléculas intersticiales de la segunda capa, es la precursora de los hielos de alta densidad.



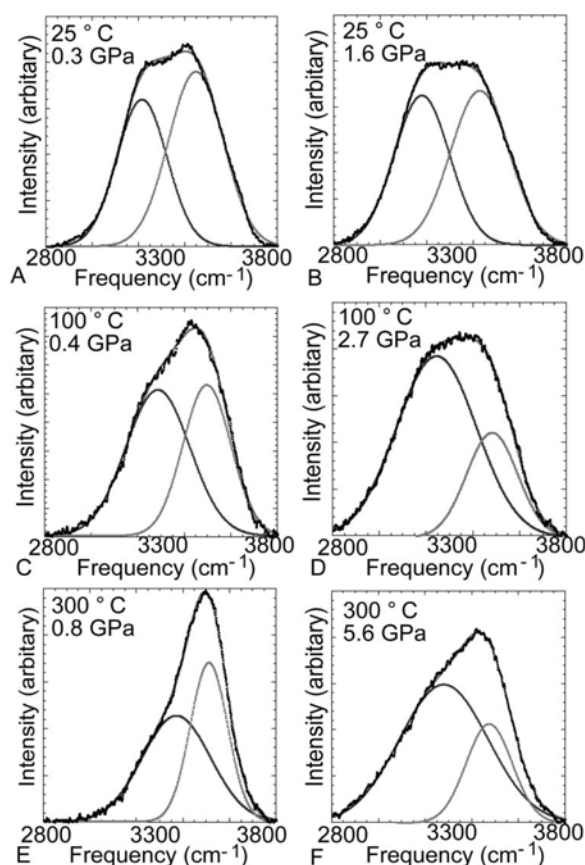
**Figura 4.12.** Diagrama de fases del agua de acuerdo con los datos de la Ref. [44]. La región mostrada con rayas delimita la región del agua de baja densidad y de alta densidad.

- **Espectroscopía Raman**

Los experimentos llevados a cabo por Kawamoto y col.<sup>50</sup> mediante espectroscopía Raman en el agua en condiciones de alta presión y temperatura muestran una discontinuidad en la variación de la frecuencia de la banda de la tensión OH.<sup>50</sup>

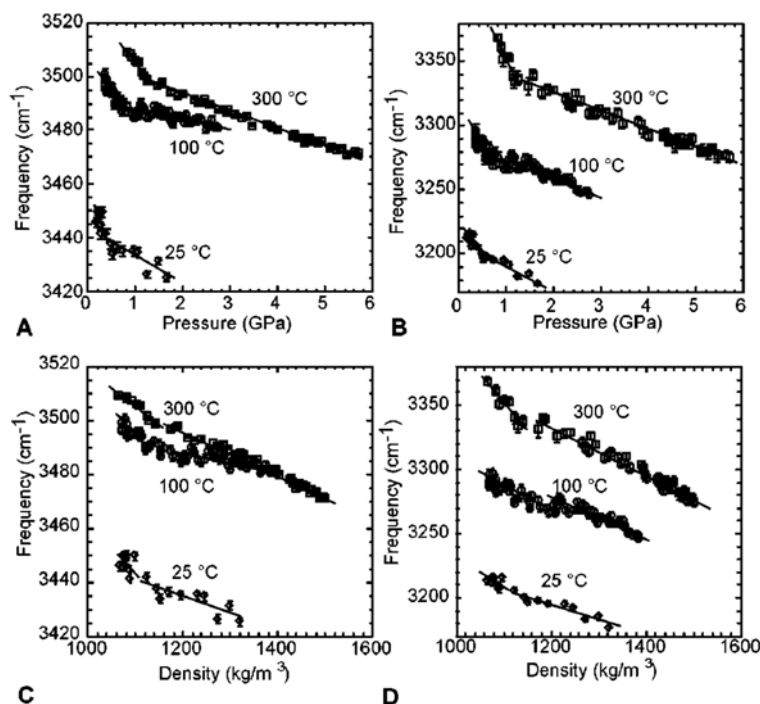
Como se puede observar en la Figura 4.13, al aumentar la presión, la intensidad de la banda de menor frecuencia ( $3200\text{ cm}^{-1}$  en condiciones ambientales), aumenta para cada temperatura. La componente de alta frecuencia se atribuye a moléculas menos asociadas, mientras que las componentes de menor frecuencia se deben a

moléculas con más enlaces de hidrógeno. Basándose en esta asignación, estos resultados sugieren que la cantidad de moléculas con más enlaces de hidrógeno aumenta al aumentar la presión.



**Figura 4.13.** Espectros Raman del agua tomados de la Ref. [50]. **(a)** 0.3 GPa y 25 °C, **(b)** 1.6 GPa y 25 °C, **(c)** 0.4 GPa y 100 °C, **(d)** 2.7 GPa y 100 °C, **(e)** 0.8 GPa y 300 °C y **(f)** 5.6 GPa y 300 °C.

En la Figura 4.14 se ha representado la variación con la presión de la frecuencia Raman de las dos componentes de la banda de la tensión O–H. A temperatura constante, ambas frecuencias disminuyen con la presión y, a presión constante, ambas frecuencias aumentan al aumentar la temperatura. Esto sugiere que la fuerza de los enlaces de hidrógeno aumenta al aumentar la presión y disminuye al aumentar la temperatura. A una temperatura dada, la pendiente de las frecuencias en función de la presión cambia significativamente a una determinada presión. A medida que la presión aumenta, la fuerza del enlace de hidrógeno también aumenta rápidamente en los intervalos de presión hasta  $(0.4 \pm 0.1)$  GPa a 298.15 K,  $(1.0 \pm 0.1)$  GPa a 373.15 K y  $(1.3 \pm 0.1)$  GPa a 573.15 K, y lentamente por encima de estas presiones. Esto viene a demostrar la existencia de discontinuidades en la respuesta a la presión del enlace de hidrógeno, lo que sugiere un cambio estructural bajo estas condiciones.



**Figura 4.14.** Frecuencias Raman de las componentes de la banda de la tensión O-H del agua a 25, 100 y 300 °C en función de la presión [(A), (B)] y densidad [(C), (D)]. Las frecuencias Raman muestran una discontinuidad en la variación con la presión a  $(0.4 \pm 0.1)$  GPa y 25 °C,  $(1.0 \pm 0.1)$  GPa a 100 °C, y a  $(1.3 \pm 0.1)$  GPa y 300 °C. Figura tomada de la Ref. [50].

El hecho de que la frecuencia Raman también cambie, refleja cambios en la densidad, es decir, que existen diferentes comportamientos de compresión del agua líquida, lo que puede sugerir un cambio estructural. Como ya se ha visto,<sup>43</sup> se propuso que el agua de alta densidad es estable para presiones superiores a 0.4 GPa a 268.15 K, consistente con los datos obtenidos mediante espectroscopía Raman por Kawamoto y col. Sin embargo, la variación que obtienen de la curva  $p_{tr}(T)$  que delimita la región del LDW de la del HDW, es inconsistente con la calculada con simulaciones de dinámica molecular por Saitta y Datchi, donde la curva tiene una ligera pendiente negativa.

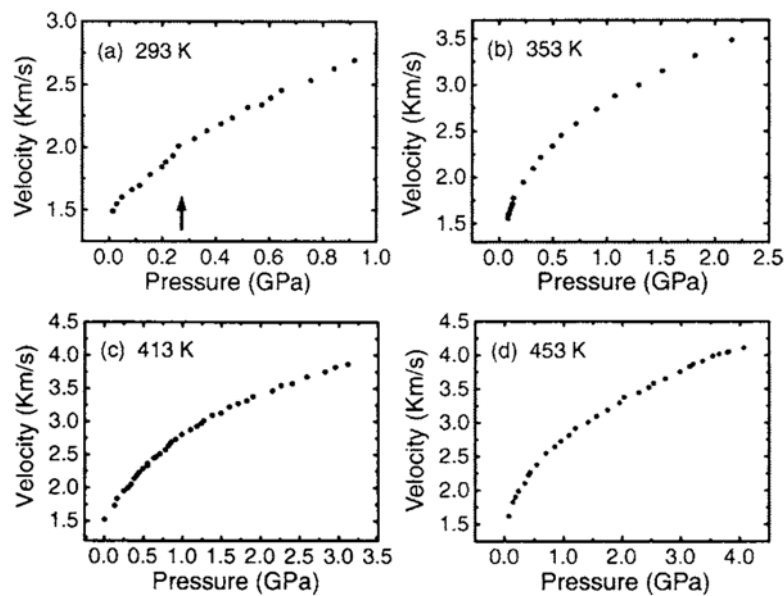
Por otro lado, mediante espectroscopía Raman también se ha observado, que el HDW tiene algunas unidades estructurales interpenetradas. Además, se han estudiado los hielos, y no se ha observado en ellos una variación tan grande en la frecuencia Raman como en la transición del LDW al HDW.

- **Dispersión Brillouin**

Mediante esta técnica<sup>51</sup> se han estudiado también las transformaciones estructurales que ocurren en el tránsito de LDW a HDW hasta una temperatura de 453.15 K y presiones hasta la solidificación.

La dispersión Brillouin es una buena técnica para determinar la velocidad del sonido y las propiedades elásticas de sistemas líquidos, de hecho el agua se ha estudiado mediante esta técnica durante años. En los años ochenta, Maisano y colaboradores estudiaron el proceso de relajación del agua subenfriada mediante esta técnica.<sup>52</sup> Para los líquidos, las propiedades elásticas se describen sólo mediante un parámetro,  $C_{11}$  que se relaciona con la velocidad del sonido ( $v$ ) mediante la ecuación  $C_{11} = \rho v^2$ .

De acuerdo con los datos obtenidos por Li y col. la velocidad del sonido aumenta de forma continua con la presión a temperatura constante, como se muestra en la Figura 4.15, y sólo disminuye de forma moderada cuando la temperatura se aumenta a 453.15 K.<sup>53</sup> A una temperatura de 293.15 K y una presión de unos 0.29 GPa se observa un cambio de tendencia, lo que ha sido considerado por investigadores como una prueba de la transición en el agua líquida. A otras temperaturas, la velocidad del sonido aumenta de forma suave, con pequeñas pérdidas de la linealidad, por lo que resulta complicado establecer la presión a la que ocurre la transición.



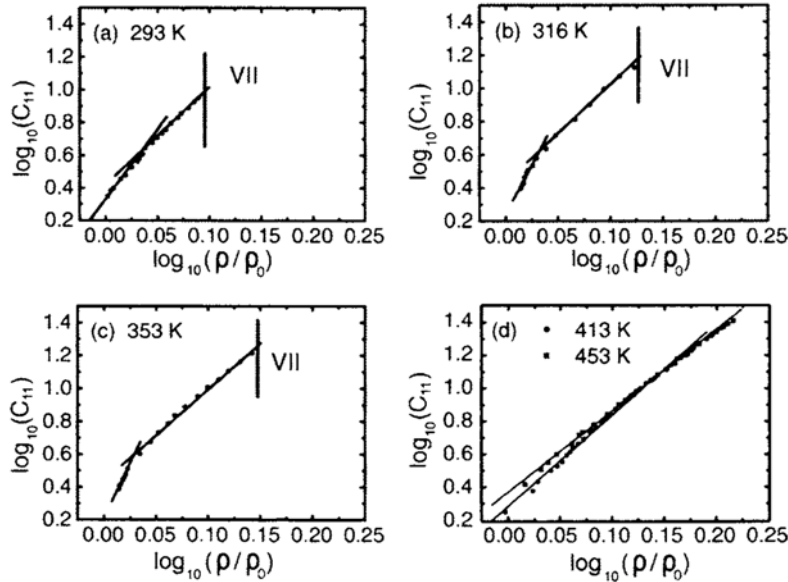
**Figura 4.15.** Representación de la variación de la velocidad del sonido con la presión a **(a)** 293.15 K, **(b)** 353.15 K, **(c)** 413.15 K y **(d)** 453.15 K. Figura tomada de la Ref. [51].

Por otro lado, se ha observado que la dependencia con la presión de la constante elástica hidrodinámica  $C_{11}$  a altas temperaturas presenta discontinuidades, lo que ha sido considerado una prueba más de la transición del LDW al HDW.<sup>51</sup>

Como se muestra en la Figura 4.16, al representar el logaritmo de  $C_{11}$  frente al logaritmo del cociente de la densidad del agua a una presión determinada,  $\rho$ , entre la densidad del agua a 1 atm,  $\rho_0$ , se observa que, a 293.15 K, se produce un descenso

abrupto de la pendiente a unos 0.29 GPa. Este mismo fenómeno lo podemos observar a 316.15 K a una presión de unos 0.21 GPa, y a 353.15 K a una presión de unos 0.19 GPa. A temperaturas más altas, como 413.15 y 453.15 K, no se tiene precisión para observar discontinuidades en la pendiente. Con estos resultados los autores han concluido que la discontinuidad en la pendiente representa la existencia de una transición estructural, que se ha asignado con la transición líquido-líquido del LDW al HDW.

Con los experimentos con difracción de neutrones,<sup>43</sup> Soper y col. concluyeron que la estructura del HDW no está formada por tetraedros y que la segunda capa de coordinación está colapsada sobre la primera con los enlaces de hidrógeno rotos, por lo que el HDW tiene una segunda capa más compacta que el LDW, lo que quiere decir que el HDW es más difícil de comprimir.



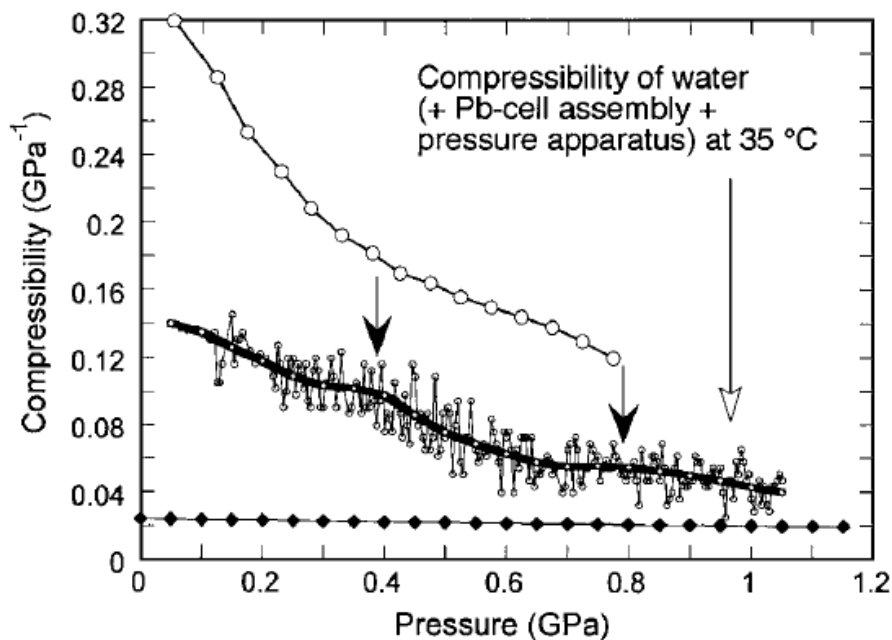
**Figura 4.16.** Representación del logaritmo de la constante elástica frente al logaritmo de la densidad a diferentes temperaturas. Las líneas verticales indican la presión de solidificación cuando la densidad aumenta. Las pendientes disminuyen de forma acusada de: **(a)** 7.63 a 6.05 a 293 K, **(b)** 11.71 a 5.90 a 316 K, **(c)** 13.17 a 5.60 a 353 K. **(d)** A 413 K y 453 K se ajustan a unas rectas de pendiente 5.51 y 4.93 respectivamente. La presión de transición es demasiado baja como para poder determinarla mediante experimentos con DAC. Figura tomada de la Ref. [51].

Como vemos en la Figura 4.16, la gran pendiente que presenta la zona correspondiente al LDW, indica que es fácilmente compresible y que se transforma a una estructura más compacta. Li y col. también han concluido del análisis de las pendientes que, en el caso del LDW, las moléculas de agua tiene más energía cinética y las distancias entre ellas se hacen mayores a medida que aumenta la temperatura, puesto que las pendientes aumentan con la temperatura. Resulta interesante observar

que las pendientes de la región correspondiente al HDW son casi invariables con la temperatura, lo que se puede deber a la propia estructura de este tipo de agua.

- **Compresibilidad**

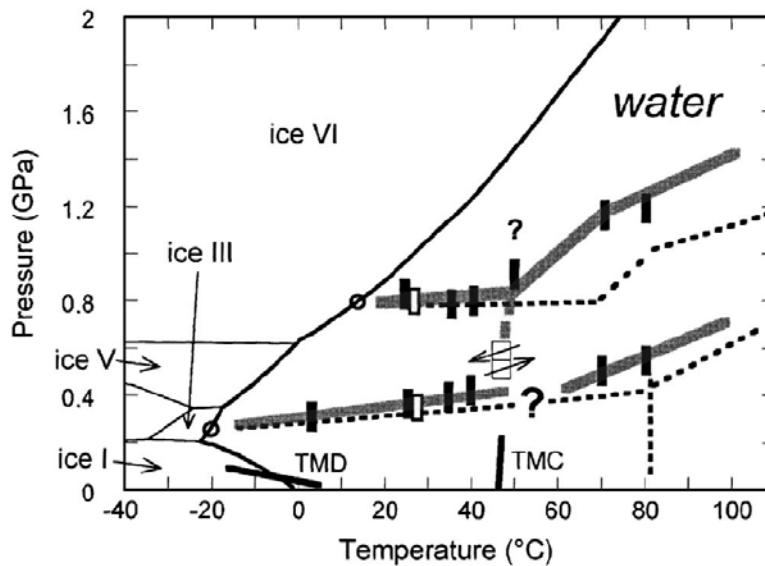
Por último, Mirwald mediante la técnica de compresibilidad,<sup>54</sup> ha llevado a cabo experimentos de forma isotérmica entre 273.15 y 353.15 K y hasta presiones de 1.6 GPa. Para ello se ha utilizado un equipo de alta presión formado por un pistón cilíndrico y varias vasijas ensambladas. En la Figura 4.17 se muestran sus resultados para la compresibilidad del agua a 308.15 K. Observamos que la compresibilidad muestra una disminución con la presión con la presencia de dos hombros alrededor de 0.3-0.4 y 0.8 GPa marcados con unas flechas negras en la figura.



**Figura 4.17.** Compresibilidad del agua en función de la presión a 35 °C. Por comparación se representan las compresibilidades relativas del agua<sup>55</sup> ( $\circ$ ) y el plomo<sup>56</sup> ( $\blacktriangle$ ). Figura tomada de la Ref. [54].

También se realizaron experimentos con velocidad más lenta de compresión y descompresión isoterma en agua a 276.15, 298.15, 308.15, 313.15, 323.15, 343.15 y 353.15 K hasta 1.5 GPa. En la Figura 4.18 se muestra un diagrama presión-temperatura con las diferentes anomalías encontradas en comportamiento del agua.





**Figura 4.18.** Diagrama presión temperatura del agua basado en los datos experimentales de los experimentos llevados a cabo mediante medidas de compresión entre 273.15 y 353.15 K y hasta 1.5 GPa y estudios previos<sup>57</sup>. (○) Curva de fusión del hielo<sup>58</sup> III y VI. (---) Comportamiento anómalo del agua basado en los datos de la Ref. [50]. Los rectángulos rellenos corresponden a los experimentos con velocidad de compresión rápida, y los rectángulos vacíos corresponden a una compresión rápida de agua con NaCl. Figura tomada de la Ref. [54].

De acuerdo con los resultados de Mirwald, los valores de las compresibilidades obtenidos a partir de los experimentos de compresión muestran un comportamiento abrupto en el diagrama PVT formando dos regiones límite anómalas. Estas dos regiones límite se forman desde la línea de fusión del hielo III, alrededor de 250 MPa y 253.15 K, y del hielo VI a 800 MPa y 286.15 K. Ambas regiones límite tienen una pendiente positiva que delimitan tres zonas de propiedades PVT del agua diferentes.

Como se verá más adelante, los resultados obtenidos en esta tesis para la región límite entre el HDW y el LDW serán comparados con todos los datos experimentales y de simulación que se acaban de describir.

#### 4.1.5 Velocidad del sonido bajo presión

El trabajo de Wagner y Pruß a través de la Asociación Internacional para las Propiedades del Agua y el vapor (*International Association for the Properties of Water and Steam*, IAPWS) recopila gran cantidad de información sobre las propiedades termodinámicas del agua utilizadas para formular una ecuación de estado del agua.<sup>59</sup>

En lo que se refiere a las medidas de velocidad del sonido en agua bajo presión, los datos experimentales con los que se cuenta, tienen en general una buena

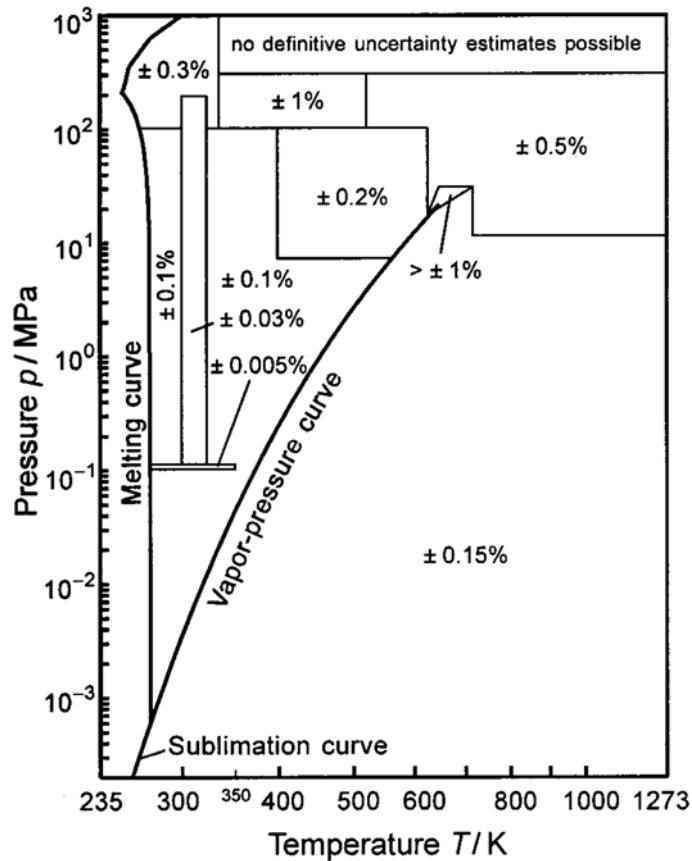
precisión, por lo que esta propiedad se ha usado para formular la ecuación de estado del agua. Como vemos en la Tabla 4.1, sólo algunos valores de los medidos por los diferentes autores se han considerado lo suficientemente precisos como para poder ser utilizados a la hora de formular la ecuación de estado en un intervalo de presión y temperatura dado.

**Tabla 4.1.** Intervalos de presión, temperatura e incertidumbre de los datos recopilados por IAPWS-95 y que han sido incluidos y utilizados para la ecuación de estado del agua en la Ref. [59].

Autor	Intervalo de Temperatura K	Intervalo de presión MPa	Incertidumbre $\Delta w$	Número de datos	
				Totales	Seleccionados
Wilson <sup>60</sup>	283 - 364	0.1 - 97	$\pm 0.05 \%$	88	32
Holton <sup>61</sup>	323	103 - 983	$\pm 0.2\%$	34	26
Del Grosso & Mader <sup>62</sup>	273 - 368	0.1013	$\pm 0.015 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	148	148
Mamedov <sup>63</sup>	273 - 623	5 - 71	$\pm 0.5 \%$	83	83
Petit <sup>64</sup>	253 - 296	0.1 - 461	$\pm 0.05 \%$	105	67
Fujii & Masui <sup>65</sup>	293 - 348	0.1013	$\pm 0.015 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	41	41
Fujii <sup>66</sup>	303 - 323	0.1 - 200	$\pm 0.005 \%$	47	47

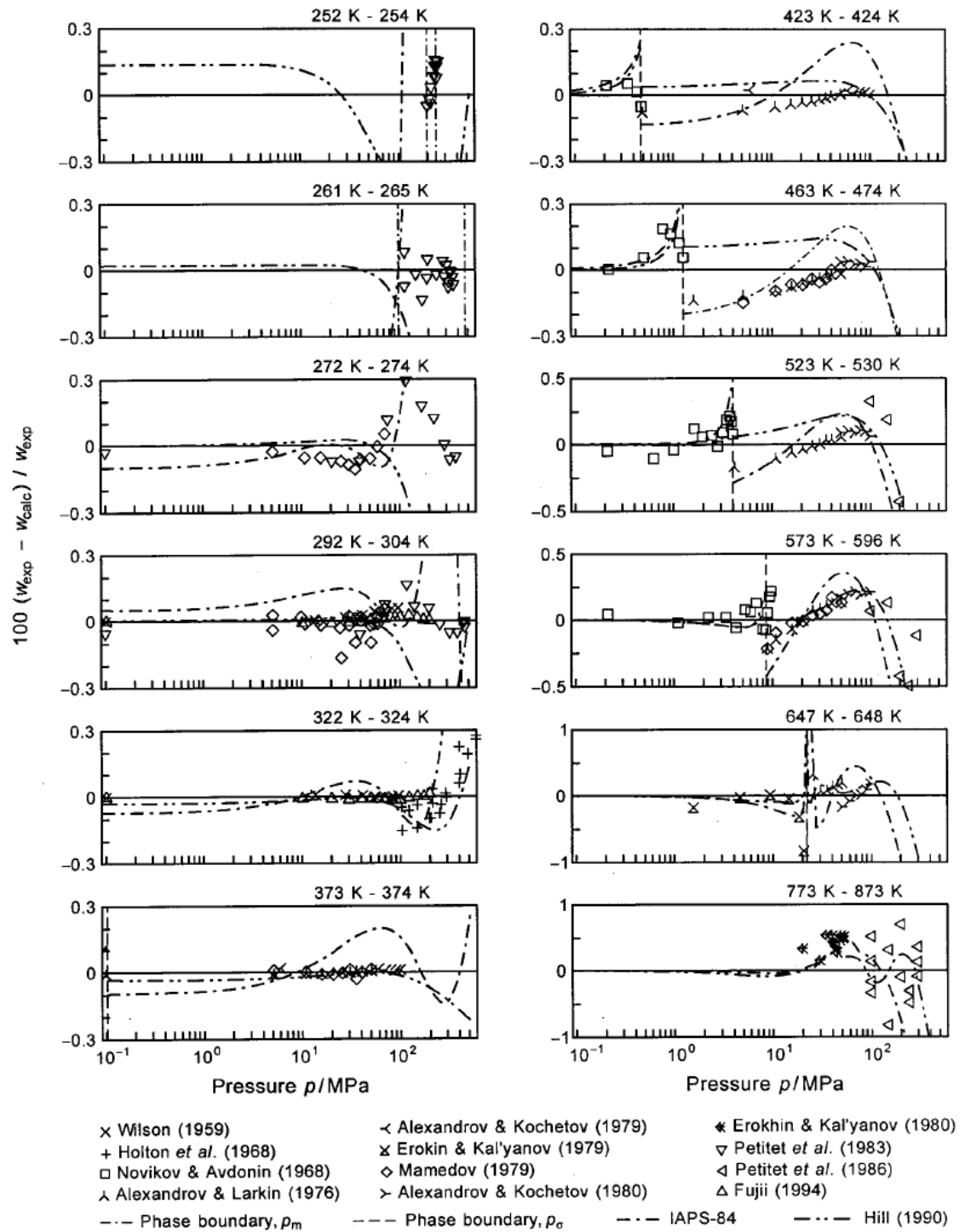
Resultan de gran importancia los valores de velocidad del sonido medidos a presión atmosférica para la fase líquida. Estos datos fueron medidos por dos grupos de investigación, por Del Grosso y Mader<sup>62</sup> y por Fujii y Masui.<sup>65</sup> La alta precisión que tienen estos datos de velocidad del sonido, con incertidumbres absolutas de tan sólo  $\pm 0.015 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , corresponde a incertidumbres relativas de alrededor de 610 ppm, y se han podido utilizar para la calibración de muchos equipos de medida de velocidad del sonido en agua, como ha sido el caso de esta tesis.

En la Figura 4.19 se ha representado la incertidumbre en la velocidad del sonido calculada con la formulación IAPWS-95 para diferentes regiones del diagrama de fases. Como se puede ver en determinadas regiones, la incertidumbre es bastante alta. En la región de interés para esta tesis, entre 253.15 y 348.15 K y presiones hasta 700 MPa, la incertidumbre es de 0.1 % hasta presiones de 400 MPa, excepto a temperatura ambiente que es algo menor, 0.03 %. A presiones superiores la incertidumbre es algo mayor, del orden de 0.3 %.



**Figura 4.19.** Representación de la incertidumbre de la velocidad del sonido en función de la presión y la temperatura calculada mediante la ecuación IAPWS-95 de la Ref. [59].

En la Figura 4.20 se muestran las desviaciones de los valores de velocidad del sonido calculados mediante la ecuación de estado, respecto a los valores experimentales frente a la presión para varios intervalos de temperatura. Se puede apreciar cómo las desviaciones mayores corresponden habitualmente cuando los valores están próximos a un cambio de fase o a presiones elevadas.



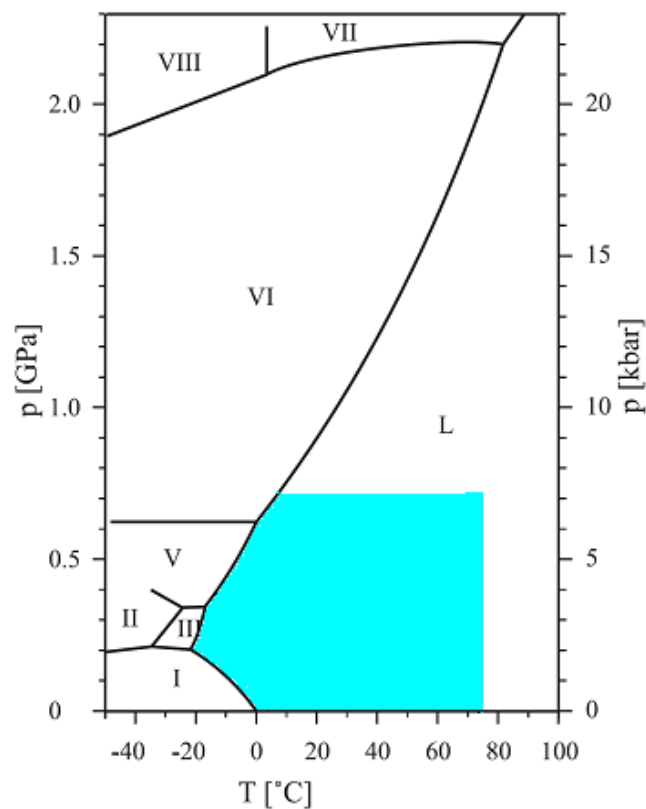
**Figura 4.20.** Representación de las desviaciones entre los datos experimentales de velocidad del sonido,  $w$ , y los valores calculados a partir de la ecuación de estado de la IAPWS-95. También se representan a modo de comparación los valores obtenidos mediante la anterior ecuación IAPS-85 y la ecuación de Hill. En las dos primeras figuras, la región del agua líquida estable está bordeada por dos líneas de cambio de fase de la presión de fusión,  $p_m$ . Figura tomada de la Ref. [59].

## 4.2 Procedimiento experimental

En el Capítulo 3 se hizo una descripción pormenorizada de los equipos utilizados en esta tesis, por lo que en este capítulo, dedicado al estudio del agua, sólo se mencionarán los aspectos más relevantes y específicos de los experimentos llevados a cabo para el estudio del agua.

En dicho estudio se ha utilizado la técnica de transmisión de ultrasonidos. La muestra de agua milli Q, desgasificada previamente, se introduce en el contenedor de muestra cilíndrico, se acopla al cabezal con la célula de medida de propiedades acústicas y finalmente se introduce en la vasija de alta presión, que se sumerge en un tanque termostatzado a la temperatura de trabajo.

Para hacer el estudio del agua mediante ultrasonidos en función de la presión se ha trabajado a lo largo de trece isothermas: 253.15, 258.15, 263.15, 268.15, 273.15, 278.15, 288.15, 298.15, 308.15, 318.15, 328.15, 338.15 y 348.15 K. Debido a los cambios de fase que sufre el agua a lo largo de algunas de las isothermas de trabajo, el barrido de presión no se pudo hacer en todo el intervalo que permite el equipo de alta presión (0.1 a 700 MPa), sino únicamente en el intervalo de presión en el que el agua permanece líquida. En la Figura 4.21 se ha marcado en azul la región en la que se han llevado a cabo los experimentos.



**Figura 4.21.** Diagrama de fases del agua

Los experimentos se hicieron por triplicado para todas las isotermas excepto para las de 338.15 y 348.15 K, donde sólo se hizo un experimento. En los triplicados, se hicieron dos experimentos con incrementos de presión mayores y un tercero en el que el incremento de presión era de 10 ó 20 MPa a lo sumo en las zonas de presión que eran de menor interés. En la Tabla 4.2 se resumen las condiciones de los experimentos realizados de medida de velocidad del sonido.

**Tabla 4.2.** Tabla resumen de los experimentos llevados a cabo mediante medidas de ultrasonidos y las condiciones de trabajo.

Temperatura K	Experimentos	P <sub>inicial</sub> - P <sub>final</sub> MPa	$\Delta P$ MPa
253.15	N1 N2 N3	200 – 245	5
258.15	N1	170 – 350	5
	N2 N3	175 – 375	25
263.15	N1	120 – 430	10
	N2 N3	125 – 450	25
268.15	N1	70 – 520	10
	N2 N3	75 – 525	25
273.15	N1 N2	0.1 – 600	50
	N3	0.1 – 700	10
278.15	N1	0.1 – 700	30, 10 y 20
	N2 N3		50
288.15	N1	0.1 – 700	30, 10 y 20
	N2 N3		50 y 100
298.15	N1 N2	0.1 – 700	10
	N3		50
308.15	N1	0.1 – 700	30, 10 y 20
	N2 N3		50
318.15	N1	0.1 – 700	30, 10 y 20
	N2 N3		50
328.15	N1	0.1 – 700	30, 10 y 20
	N2 N3		50
	N4		10
338.15	N1	0.1 – 700	10
348.15	N2	0.1 – 700	10

Al comienzo de cada experimento, se seleccionó en el baño la temperatura de trabajo y se sumergió la vasija en el tanque termostatzado, esperando a que se alcanzara la temperatura de trabajo y a que la muestra, situada en el interior del cilindro portamuestras, alcanzase la temperatura deseada. Este proceso, tenía una duración variable en función de la temperatura seleccionada.

Las medidas que se hicieron a temperatura por debajo de 273.15 K (temperatura de fusión del agua) requirieron de una serie de precauciones. En primer lugar, se substituyó el fluido termostatzador del tanque en el que se sumerge la vasija de alta presión por etanol, que se guardaba durante la noche refrigerado para facilitar el proceso de enfriamiento al día siguiente. En segundo lugar, al estar trabajando a temperaturas por debajo del punto de fusión del agua, esto requirió introducir la muestra de agua líquida y subir rápidamente la presión para evitar que el agua cambiase a fase sólida, hasta el primer valor de presión del experimento, en el que el agua se encontraba en fase líquida. En este punto, se esperaba el tiempo necesario hasta que la muestra se encontrase a la temperatura de trabajo.

La finalización de los experimentos por debajo de 273.15 K también necesitó ciertas precauciones. El proceso de expansión desde una presión  $p_{final}$  hasta presión atmosférica,  $p_0$ , produce el efecto contrario a la compresión, es decir, un enfriamiento de la muestra. Este proceso debía hacerse muy lentamente evitando entrar en la región en la que el agua se encuentra en estado sólido, ya que al ocupar el sólido (hielo) mayor volumen que el líquido (agua) podía romper la célula de medida de propiedades acústicas, en concreto, la parte más sensible de ésta que son los piezoelectrónicos.

En las medidas por debajo del punto de congelación del agua, se observó un fenómeno curioso que no hemos sabido explicar por completo. Los experimentos se hicieron por triplicado: dos de ellos con incrementos de presión más grandes (cada 25 MPa) y un tercero con un incremento de presión pequeño (cada 5 ó 10 MPa). Se observó que cuando la compresión se hacía con incrementos grandes, el tiempo de vuelo, y por tanto la velocidad del sonido, seguía la variación esperada; en cambio, cuando los incrementos de presión eran más pequeños, el tiempo de vuelo, y por consiguiente la velocidad del sonido, apenas variaba o se mantenía constante. Este hecho será discutido posteriormente en el apartado de resultados.

### 4.2.1 Incertidumbre de las medidas

En este apartado se desarrollará cómo se han calculado las incertidumbre en las medidas de velocidad del sonido y cuáles son los factores que afectan a las mismas. Hay que tener en cuenta que las incertidumbres en las condiciones límite para cada experimento siempre serán mayores, en nuestro caso, en los valores máximos de presión o cuando la diferencia de temperatura es mayor con respecto a la ambiente.

- **Incertidumbre sobre la medida de la temperatura**

A la hora de medir la temperatura hay que tener en cuenta que ésta viene acompañada de una serie de incertidumbres que afectan a la precisión con la que se obtiene la magnitud final, en este caso la velocidad del sonido. En la siguiente expresión se muestra la ecuación utilizada para la determinación de la incertidumbre sobre la medida de la temperatura:

$$u_c(T) = \sqrt{u^2(T_u) + u^2(T_{cal}) + u^2(T_{rep})} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

El primer término,  $u(T_u)$ , es la incertidumbre dada por las especificaciones del sensor, el segundo término,  $u(T_{cal})$ , es la incertidumbre de la calibración y el tercer término,  $u(T_{rep})$  es la repetibilidad de las medidas. El resultado global de la incertidumbre para la temperatura  $u_c(T) = 0.14$  K para la mayoría de temperaturas.

- **Incertidumbre sobre la medida de la presión**

En el caso de la incertidumbre sobre la presión, se utilizó una expresión similar a la anterior, siendo en este caso el valor de la incertidumbre en la presión:

$$u_c(p) = \sqrt{u^2(p_u) + u^2(p_{cal}) + u^2(p_{rep})} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Los términos de la ecuación son similares que en el caso de la temperatura: el primero,  $u(p_u)$ , es la incertidumbre dada por el sensor de presión, el segundo término,  $u(p_{cal})$ , se debe a la incertidumbre de calibración y el tercero,  $u(p_{rep})$ , se debe a la reproducibilidad de las medidas. El resultado global para la incertidumbre sobre la presión es  $u_c(p) = 0.005 \cdot p$  MPa. Si se asume que los valores estimados de temperatura y presión siguen una distribución normal dentro de los intervalos definidos por las respectivas incertidumbres estándar combinadas ( $u_c(T)$  y  $u_c(p)$ ), los valores de temperatura y presión se encuentran en sus respectivos intervalos con un nivel de confianza del 68 %.



- **Efecto de la incertidumbre de la presión sobre la velocidad del sonido**

Finalmente, hay que tener en cuenta la incertidumbre estándar combinada para la velocidad del sonido,  $u_c(w)$ . Para ello se utilizó la siguiente expresión:

$$u_c(w) = \sqrt{u^2(w) + u^2(w_{uT}) + u^2(w_{up})} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

donde  $u(w)$  es la incertidumbre estándar combinada en las medidas de velocidad del sonido y  $u(w_{uT})$  y  $u(w_{up})$  son las incertidumbres en la velocidad del sonido debidas a las incertidumbres en las medidas de la temperatura y la presión respectivamente.

La incertidumbre  $u(w)$  se calculó mediante la aplicación de la ley de propagación de incertidumbres según la Ecuación 4.4:

$$u(w) = \sqrt{\left(\frac{\partial w}{\partial \tau_{cal}}\right)^2 u^2(\tau_{cal}) + \left(\frac{\partial w}{\partial \tau_p}\right)^2 u^2(\tau_p) + \left(\frac{\partial w}{\partial w_{cal}}\right)^2 u^2(w_{cal}) + \left(\frac{\partial w}{\partial p_{cal}}\right)^2 u^2(p_{cal}) + \left(\frac{\partial w}{\partial p}\right)^2 u^2(p)} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Lo que nos da:

$$u(w) = \frac{\tau_{cal}}{\tau_p} \frac{1 - p \left( \frac{1 - 2\mu}{E} \right)}{1 - p_{cal} \left( \frac{1 - 2\mu}{E} \right)} w_{cal} \times \sqrt{\frac{u^2(\tau_{cal})}{\tau_{cal}^2} + \frac{u^2(\tau_p)}{\tau_p^2} + \frac{u^2(w_{cal})}{w_{cal}^2} + \left( \frac{1 - 2\mu}{E} \right)^2 \left( \frac{u^2(p_{cal})}{\left( 1 - p_{cal} \left( \frac{1 - 2\mu}{E} \right) \right)^2} + \frac{u^2(p)}{\left( 1 - p \left( \frac{1 - 2\mu}{E} \right) \right)^2} \right)}$$

donde  $\mu$  es el coeficiente de Poisson y  $E$ , el módulo de Young en la Ecuación 4.5.

La evaluación de las incertidumbres  $u(\tau_{cal})$ ,  $u(\tau_p)$  y  $u(w_{cal})$  se detalla a continuación.  $u(\tau_{cal})$  y  $u(\tau_p)$  representan las incertidumbres estándar combinadas para el tiempo de vuelo  $\tau$  determinado a la presión de la distancia de calibración y a la presión de medida respectivamente. Estas incertidumbres tienen en cuenta la incertidumbre relacionada con el ajuste horizontal del osciloscopio elegido para la resolución de  $u(\tau_u)$  y la incertidumbre de la repetibilidad de tres pares de ecos  $u(\tau_{rep})$ , es decir:

$$u(\tau) = \sqrt{u^2(\tau_u) + u^2(\tau_{rep})} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

donde los valores de  $u(\tau_u)$  y  $u(\tau_{rep})$  son:

$$u(\tau_u) = \frac{8.00 \cdot 10^{-10} \text{ s}^{-1}}{2\sqrt{3}} = 2.31 \cdot 10^{-10} \text{ s}^{-1} \quad \text{y} \quad u(\tau_{rep}) = \frac{\sigma_\tau}{\sqrt{3}}$$

La desviación estándar entre los tres valores obtenidos para  $\tau_{cal}$  dieron un valor de aproximadamente  $8.30 \cdot 10^9$  a 50 MPa a temperaturas por encima de 273.15 K y como máximo  $1.67 \cdot 10^{-8}$  en el resto de los casos. La desviación estándar,  $\sigma_\tau$ , entre los tres valores obtenidos para  $\tau_p$  a diferentes presiones no siguen una tendencia clara en función de la presión, por lo que la máxima desviación estándar encontrada fue la que se eligió para estimar  $u(\tau_{rep})$  a la presión  $p$ ; este valor fue como máximo de  $1.8 \cdot 10^{-8}$  s.

La incertidumbre en la velocidad del sonido en la condiciones de calibración obtenidas a partir de la IAPWS-95 viene representada por  $u(w_{cal})$ , que en las condiciones de presión de calibración fue menor o igual de 0.1 %. Por tanto, se ha considerado la máxima incertidumbre en ese valor de 0.1 %.

La incertidumbre en las medidas de temperatura  $u_c(T)$  puede conllevar una variación de la velocidad del sonido de menos de  $dw_{uT} = 0.7 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . La incertidumbre en las medidas de presión,  $u_c(p)$ , puede conducir a un cambio en la velocidad del sonido inferior a  $dw_{up} = 3.6 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Este cambio depende de la presión y su incertidumbre asociada se calculó a partir de un polinomio de grado tres. Por lo tanto, las contribuciones respectivas a la incertidumbre son:

$$u(w_{uT}) = \frac{dw_{uT}}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 4.7}$$

$$u(w_{up}) = 6.90 \cdot 10^{-9} \cdot (p / \text{MPa})^3 - 1.11 \cdot 10^{-5} \cdot (p / \text{MPa})^2 + 7.44 \cdot 10^{-3} \cdot (p / \text{MPa})$$

Finalmente, teniendo en cuenta todas las contribuciones a la incertidumbre que hemos visto, la incertidumbre estándar combinada para la velocidad del sonido en función de la presión queda de la siguiente forma:

$$u_c(w) = \sqrt{u^2(w) + u^2(w_{uT}) + u^2(w_{up})} \quad \text{Ecuación 4.8}$$

Esto produce una incertidumbre estándar relativa entre el 0.11 y 0.16 %, siendo principalmente dependiente de la presión. La incertidumbre relativa expandida de la velocidad del sonido se ha calculado con un factor de cobertura  $k$  igual a 2. Después estuvo comprendida entre 0.22 y 0.32%. Puesto que se puede asumir que los posibles valores de la velocidad del sonido  $w$  siguen aproximadamente una distribución normal con una desviación estándar  $u_c(w)$ , el valor desconocido de la velocidad del sonido se

cree que está comprendido en el intervalo definido por  $2u_c$  con un nivel de confianza de aproximadamente del 95 %.

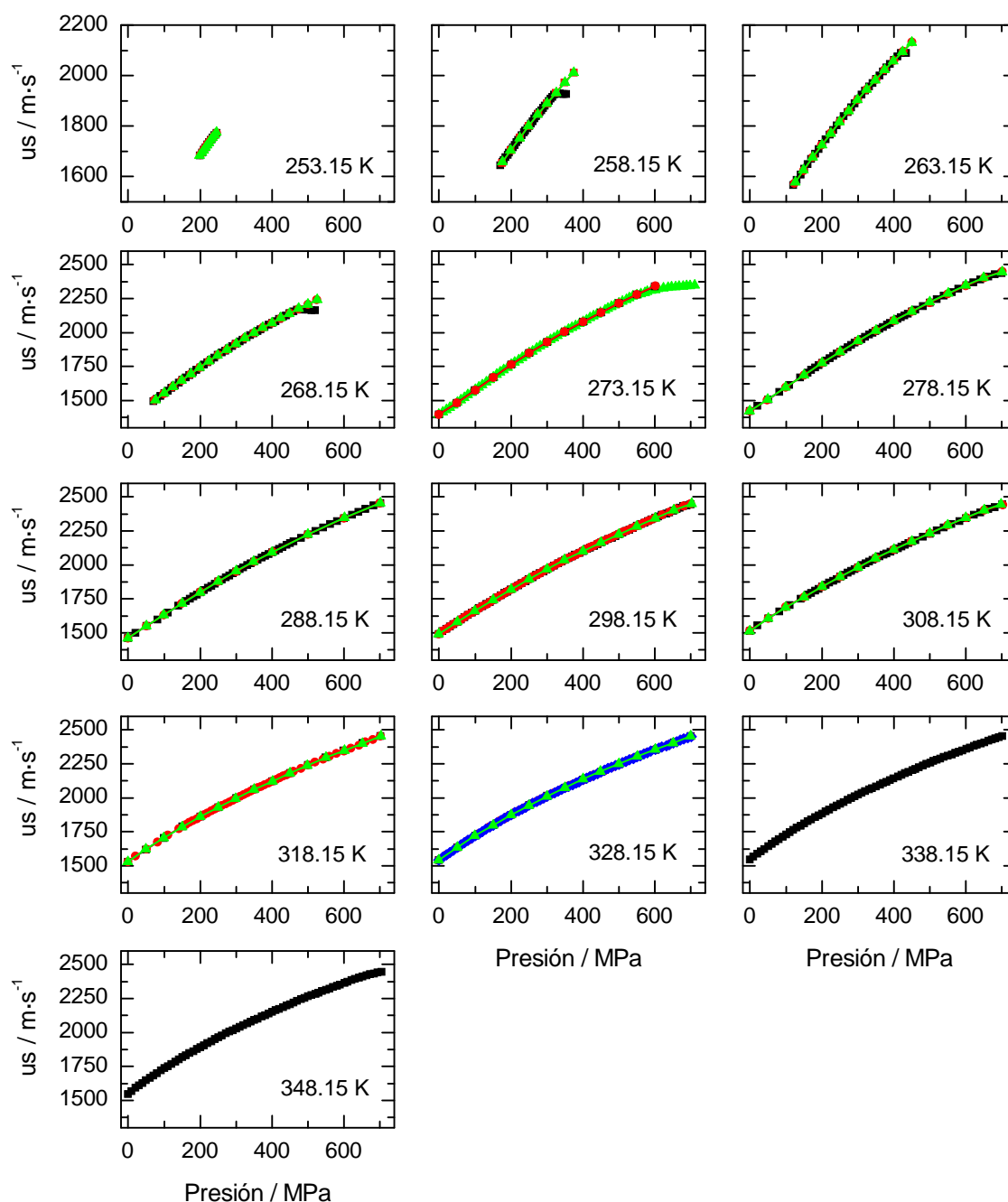
## 4.3 Resultados

En este apartado se mostrarán los resultados obtenidos para las medidas de velocidad del sonido llevadas a cabo en agua en función de la presión y la temperatura.

### 4.3.1 Velocidad del sonido

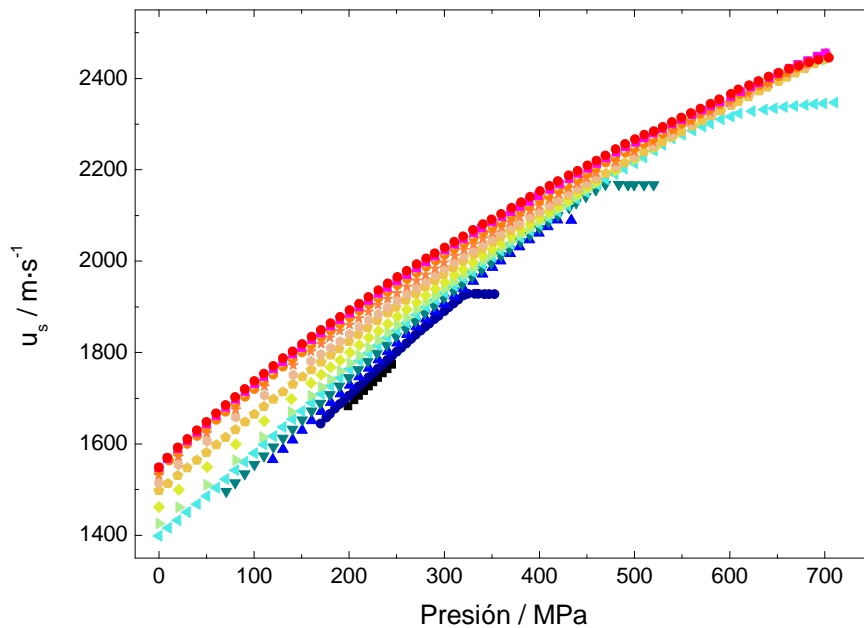
Como ya se ha mencionado anteriormente, se ha estudiado la velocidad del sonido en agua a lo largo de trece isotermas, desde 253.15 a 348.15 K y dentro del intervalo de presión en el que el agua se encuentra en fase líquida hasta un máximo de 700 MPa. La técnica utilizada ha sido la de transmisión de pulsos a través de dos piezoeléctricos, uno emisor y otro receptor separados una distancia  $d$ . Los resultados obtenidos para la velocidad del sonido se muestran en las tablas incluidas en el Apéndice I.

Para cada isoterma se hizo un triplicado excepto para 338.15 y 338.15 K donde sólo se hizo un experimento a cada temperatura. En el caso de las isotermas que se hicieron por triplicado, podemos apreciar en la Figura 4.22 que los valores de velocidad del sonido son muy reproducibles entre sí, y la única variación se debe a la reproducibilidad que existe entre los valores de presión y temperatura, es decir, para los tres experimentos no es posible tener exactamente el mismo valor de presión y temperatura  $p_i$  y  $T_i$ .



**Figura 4.22.** Velocidad del sonido frente a la presión desde 253.15 a 348.15 K para todos los experimentos realizados.

En la Figura 4.23, se representa sobre una misma gráfica las velocidades del sonido para las trece isotermas medidas y para los experimentos en los que se han hecho intervalos de compresión más pequeños. Podemos ver cómo a presiones bajas, la diferencia en la velocidad del sonido es mayor entre las distintas temperaturas, y a medida que aumenta la presión, las diferencias en la velocidad del sonido son cada vez menores, de tal forma que para temperaturas por encima de 273.15 K parece que convergen.



**Figura 4.23.** Variación de la velocidad del sonido del agua frente a la presión. (■) 253.15 K, (●) 258.15 K, (▲) 263.15 K, (▼) 268.15 K, (◄) 273.15 K, (◄) 278.15 K, (◆) 288.15 K, (●) 298.15 K, (●) 308.15 K, (★) 318.15 K, (●) 328.15 K, (■) 338.15 K, (●) 348.15 K.

#### 4.3.2 Comparación de los resultados obtenidos con la bibliografía

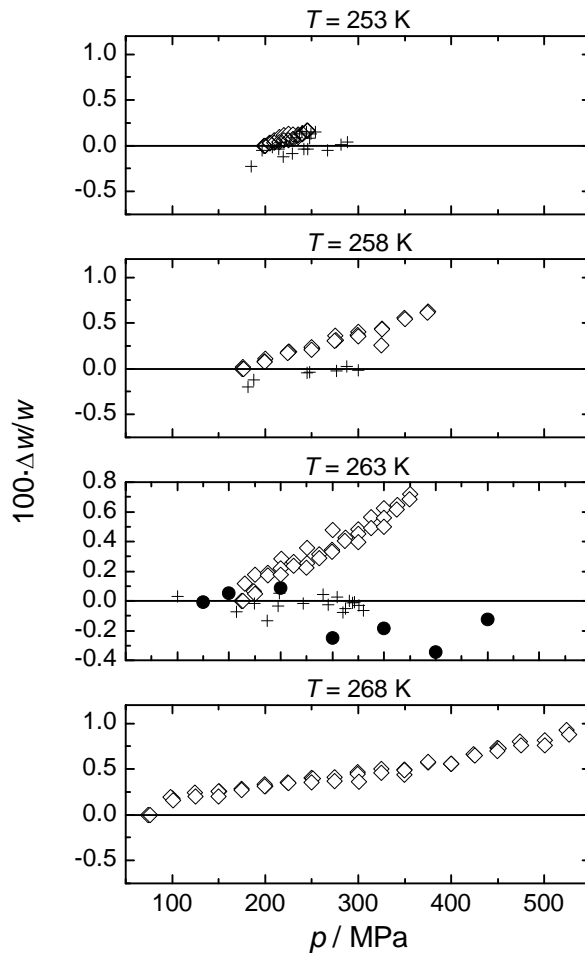
Uno de los aspectos novedosos de este trabajo de tesis ha sido la utilización de la técnica de transmisión de ultrasonidos para la determinación de la velocidad de sonido. Además, se ha ampliado el rango de presiones y temperaturas a las que se tenían datos de velocidad del sonido y con un nivel de incertidumbre bastante aceptable. Para comparar los datos obtenidos en este trabajo de tesis con los de la bibliografía se comparan las desviaciones relativas de los primeros respecto de los segundos. Como se ha comentado, se ha ampliado el rango de presiones y temperaturas, por lo que la comparación a veces no coincide exactamente con los mismos valores de temperatura.

- **Comparación con los datos de velocidad del sonido proporcionados por la bibliografía (IAPWS-95) por debajo del punto de congelación del agua**

En la Figura 4.24 se comparan las desviaciones relativas de la velocidad del sonido para las temperaturas por debajo del punto de fusión del agua. Como se ha mencionado, para algunas isothermas con las que se ha trabajado en esta tesis, no existen datos en la bibliografía por lo que se ha comparado con los datos bibliográficos que están más próximos. Esto puede hacer que las desviaciones sean mayores al comparar datos que no son exactamente de la misma temperatura. Además, se está comparando los datos con los que proporciona la ecuación de estado utilizada por la

IAPWS-95, que es una ecuación empírica formulada a partir de medidas experimentales con error e incertidumbre.

Como podemos apreciar, los datos correspondientes a este trabajo de tesis ( $\diamond$ ) presentan una tendencia positiva en la desviación de la velocidad del sonido respecto con los datos utilizados para la ecuación de ajuste de la IAPWS-95.

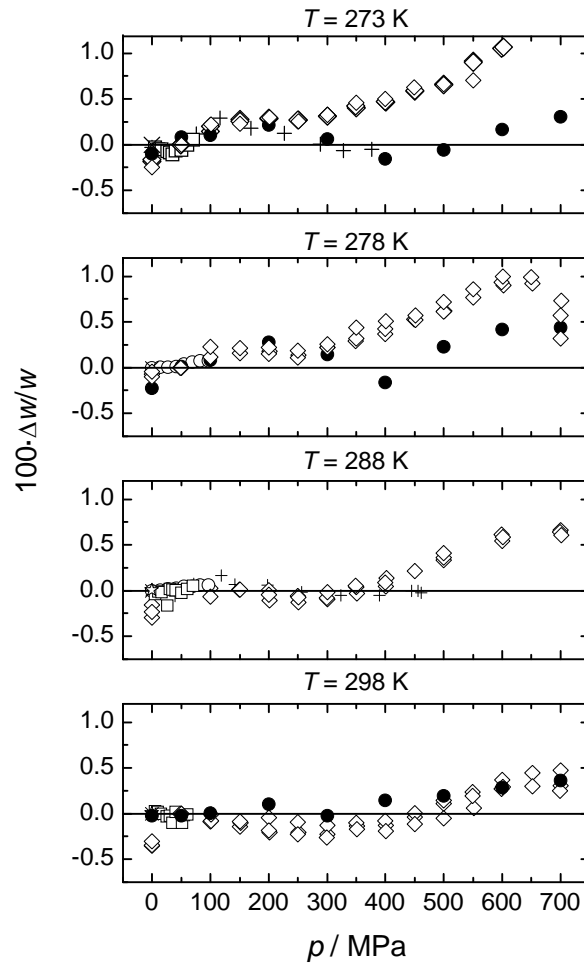


**Figura 4.24.** Comparación de la desviación relativa de la velocidad del sonido de este trabajo con los datos de la bibliografía. **T=253.15 K** ( $\diamond$ ) este trabajo, (+) Petitot<sup>64</sup>; **T=258.15 K** ( $\diamond$ ) este trabajo, (+) Petitot<sup>64</sup> (256 K); **T=263.15 K** ( $\diamond$ ) este trabajo, (+) Petitot<sup>64</sup>, ( $\odot$ ) Vance<sup>67</sup>; **T=268.15 K** ( $\diamond$ ) este trabajo.

- **Comparación con los datos de velocidad del sonido proporcionados por la bibliografía (IAPWS-95) de 273.15 a 298.15 K.**

En la Figura 4.25 podemos ver cómo los datos de este trabajo de tesis ( $\diamond$ ) presentan una desviación positiva respecto de los datos bibliográficos, esta tendencia es más acusada a las temperaturas de 273.15 K y 278.15 K. En cambio a 288.15 K y 298.15 K la desviación es menor, 0.6 % como máximo. Además se observa que a

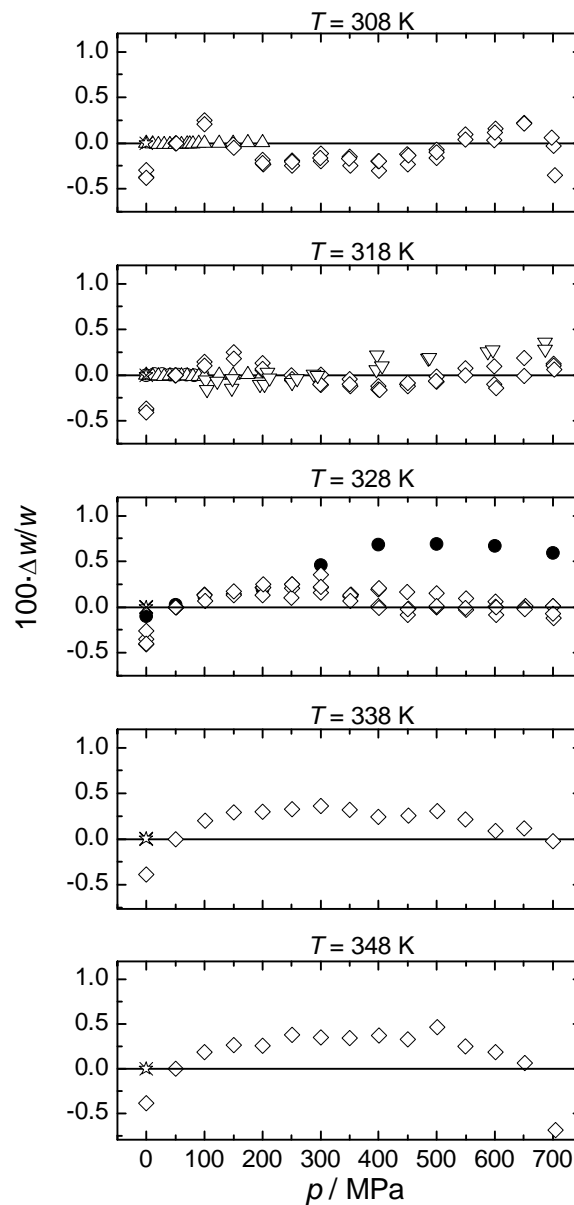
presiones moderadas, las desviaciones presentan un intervalo más o menos horizontal y a las presiones cercanas al límite del experimento éstas aumentan.



**Figura 4.25.** Comparación de la desviación relativa de la velocidad del sonido con los datos de la bibliografía. **T=273.15 K** (◇) este trabajo, (+) Petitot,<sup>64</sup> (×) Del Grosso & Mader,<sup>62</sup> (□) Mamedov,<sup>63</sup> (⊕) Vance;<sup>67</sup> **T=278.15 K** (◇) este trabajo, (×) Del Grosso & Mader,<sup>62</sup> (○) Wilson<sup>60</sup> (283 K), (⊕) Vance<sup>67</sup> (283 K); **T=288.15 K** (◇) este trabajo, (+) Petitot<sup>64</sup> (292 K), (×) Del Grosso & Mader<sup>62</sup> (293 K), (□) Mamedov<sup>63</sup> (293 K), (○) Wilson<sup>60</sup> (292 K), (☆) Fujii & Masui<sup>65</sup> (292 K); **T=298.15 K** (◇) este trabajo, (□) Mamedov<sup>63</sup> (303 K), (×) Del Grosso & Mader,<sup>62</sup> (☆) Fujii & Masui,<sup>65</sup> (⊕) Vance<sup>67</sup> (295 K).

- **Comparación con los datos de velocidad del sonido proporcionados por la bibliografía (IAPWS-95) de 308.15 a 348.15 K.**

En la Figura 4.26 se aprecia cómo los datos de este trabajo de tesis (◇) en este intervalo de temperaturas presentan menor desviación que a temperaturas inferiores e incluso, menor que los datos de la bibliografía para algunas temperaturas.



**Figura 4.26.** Comparación de la desviación relativa de la velocidad del sonido con los datos de la bibliografía. **T=308.15 K** ( $\diamond$ ) este trabajo, ( $\times$ ) Del Grosso & Mader,<sup>62</sup> ( $\star$ ) Fujii & Masui,<sup>65</sup> ( $\triangle$ ) Fujii (313 K); **T=318.15 K** ( $\diamond$ ) este trabajo, ( $\times$ ) Del Grosso & Mader<sup>62</sup> (323 K), ( $\circ$ ) Wilson<sup>60</sup> (322 K K), ( $\star$ )Fujii & Masui<sup>65</sup>, ( $\nabla$ ) Holton (323 K), ( $\triangle$ ) Fujii<sup>66</sup> (323 K); **T=328.15 K** ( $\diamond$ ) este trabajo, ( $\star$ ) Fujii & Masui,<sup>65</sup> ( $\times$ ) Del Grosso & Mader<sup>62</sup> (333 K), ( $\oplus$ ) Vance<sup>67</sup> (323 K); **T=338.15 K** ( $\diamond$ ) este trabajo, ( $\star$ ) Fujii & Masui,<sup>65</sup> ( $\times$ ) Del Grosso & Mader<sup>62</sup> (343 K); **T=348.15 K** ( $\diamond$ ) este trabajo, ( $\star$ ) Fujii & Masui,<sup>65</sup> ( $\times$ ) Del Grosso & Mader.<sup>62</sup>

#### 4.3.3 Aplicaciones de las medidas de velocidad del sonido

La velocidad del sonido es una propiedad sensible al medio por el que se transmite, es decir, que no se transmite igual por un medio gaseoso, por uno líquido o por uno sólido. Si las moléculas del medio por el que se transmite la onda ultrasónica están más separadas, ésta viajará más despacio y por tanto la velocidad del sonido será menor. Si por el contrario, la onda ultrasónica se transmite por un medio denso,



como puede ser un líquido o un sólido, ésta viajará más deprisa y la velocidad del sonido será mayor. Por tanto, vemos cómo la naturaleza del medio por el que viaja la onda ultrasónica le afecta en gran medida.

Del mismo modo, la temperatura también será una propiedad que afectará a cómo se transmite la velocidad del sonido. Para una misma sustancia, a temperaturas más altas, las moléculas de la que están formadas tienen mayor energía cinética por lo que la onda ultrasónica se transmite más deprisa y la velocidad del sonido será mayor.

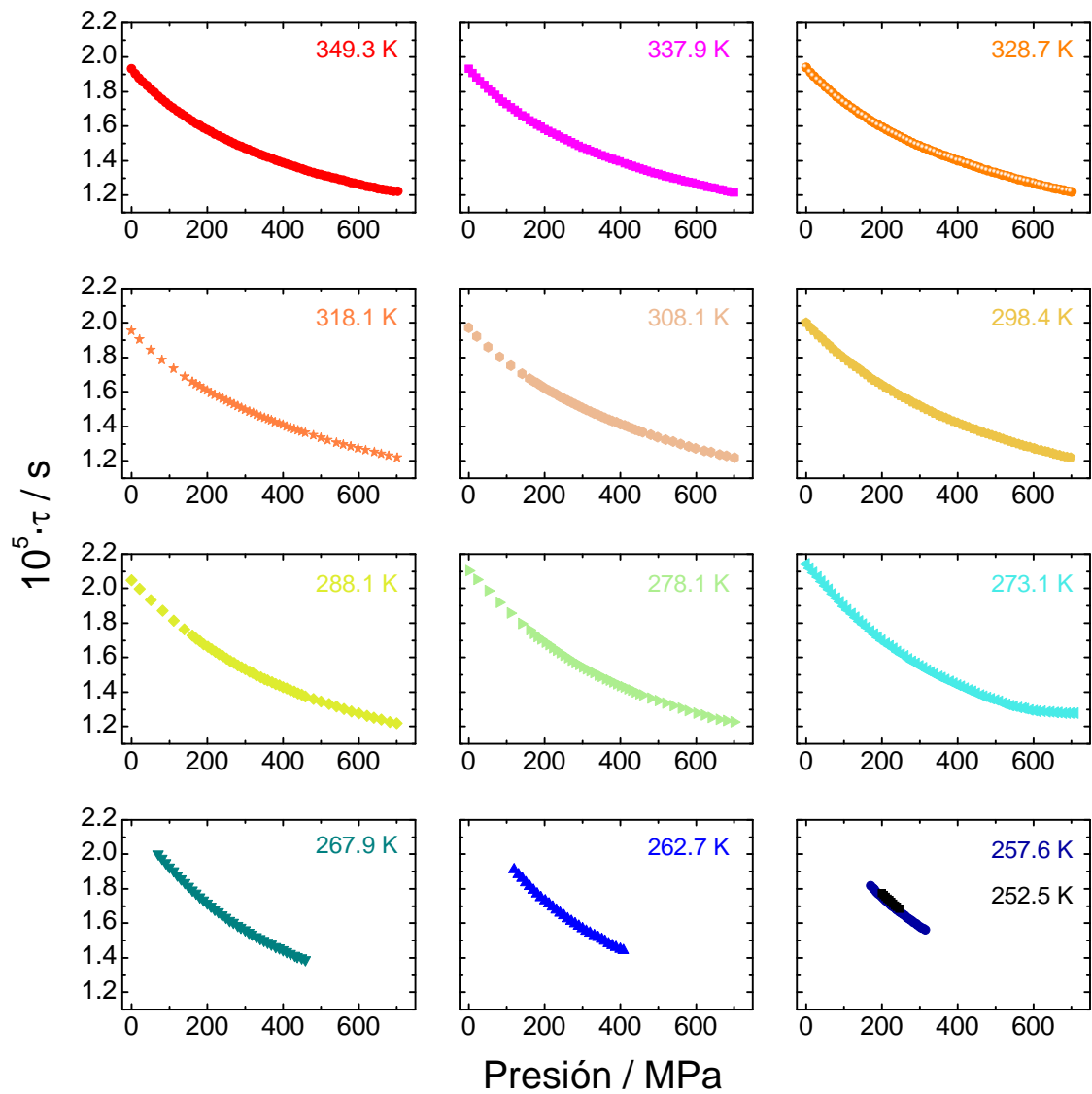
Por tanto, vemos cómo a la velocidad del sonido le afectan, entre otros factores, el estado de agregación y la temperatura del medio por el que se transmite. En este capítulo se está desarrollando el estudio del efecto de la temperatura y la presión en la velocidad del sonido. Para los experimentos llevados a cabo, siguiendo una isoterma dada, podemos considerar que la temperatura es constante en el momento de hacer la medida, puesto que la muestra se encuentra termostatzada, es decir, que la única magnitud que afecta a la velocidad del sonido es la presión.

Al aumentar la presión, las moléculas de agua se encuentran cada vez más juntas entre sí, luego la velocidad del sonido debe ser mayor, como hemos visto en la Figura 4.23. Además, si por efecto de la presión ocurre algún efecto de agregación o cambio de estructura en el agua, éste debería verse reflejado en un cambio en la velocidad del sonido.

Como se ha visto anteriormente, la velocidad del sonido viene definida por la siguiente ecuación:

$$u_s = \frac{2d}{\tau}$$

La magnitud que se mide directamente en los experimentos mediante el osciloscopio es el tiempo de vuelo,  $\tau$ , que es inversamente proporcional a la velocidad del sonido. Luego podemos trabajar con cualquiera de ellas indistintamente. En la Figura 4.27 se representa el tiempo de vuelo de cada isoterma frente a la presión.



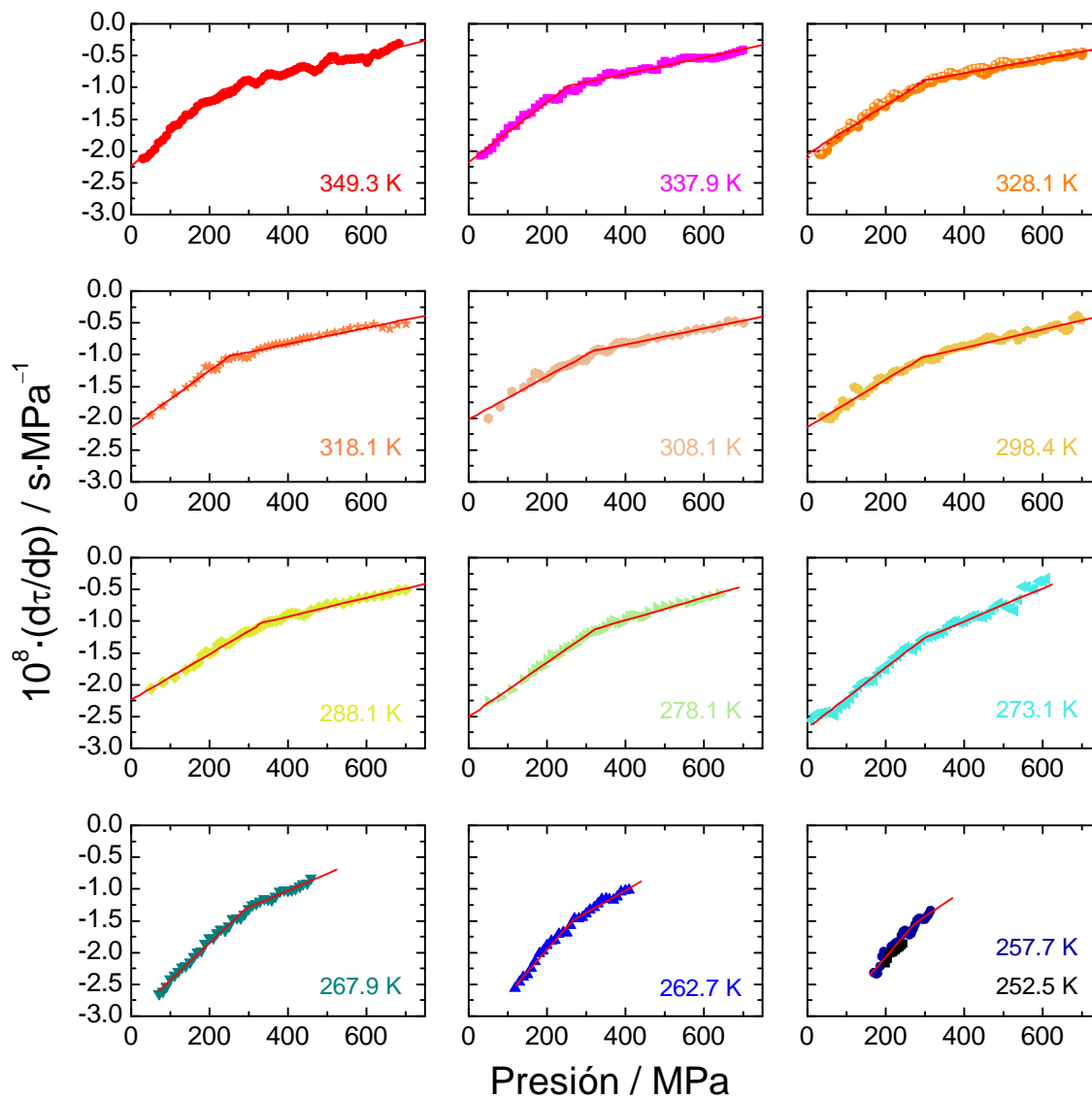
**Figura 4.27.** Representación del tiempo de vuelo frente a la presión para cada una de las temperaturas estudiadas desde 253.15 a 348.15 K. En la esquina superior izquierda se indica el valor de la temperatura media a lo largo del experimento.

Podemos ver cómo el tiempo de vuelo disminuye de forma continua con la presión, es decir, que a medida que aumenta la presión, las moléculas de agua se encuentran más cerca entre sí y la onda ultrasónica se transmite más deprisa, luego la velocidad del sonido es mayor.

- **Derivada del tiempo de vuelo**

Una forma de apreciar mejor los cambios de tendencia o comportamiento que sufre una propiedad respecto a otra es estudiar su derivada. Como hemos visto anteriormente, resulta más cómodo trabajar con el tiempo de vuelo, ya que es la magnitud que medimos directamente. El tiempo de vuelo es inversamente

proporcional a la velocidad del sonido. Puesto que lo que nos interesa es observar un cambio de tendencia en la propiedad respecto a la presión, si representamos la derivada del tiempo de vuelo,  $\tau$ , frente a la presión obtenemos las representaciones de la Figura 4.28:



**Figura 4.28.** Representación de los ajustes de la derivada del tiempo de vuelo respecto a la presión ( $d\tau/dp$ ) para todas las isotermas estudiadas.

En esta figura se aprecia un cambio de pendiente del tiempo de vuelo a una presión dada para cada isoterma. Hay que tener en cuenta que a presiones bajas algunos puntos se desvían de la linealidad, este hecho se aprecia principalmente a presiones inferiores a 50 MPa. Este fenómeno se debe a que a presiones bajas y a pesar de las precauciones previas, ésta puede contener pequeñas burbujas de aire que hacen que el tiempo de vuelo no sea exactamente el que le corresponde para esas

condiciones de presión y temperatura. Este hecho se intenta evitar al máximo al comenzar un experimento desgasificando la muestra en un baño de ultrasonidos como se ha explicado anteriormente en el Capítulo 3, pero es inevitable introducir una pequeña cantidad de aire al verter el agua en el interior del cilindro portamuestras. Por esta razón es necesario eliminar algunos puntos a presiones bajas.

- **Ajustes de la derivada del tiempo de vuelo**

A la hora de ajustar la derivada del tiempo de vuelo se ha tenido en cuenta el hecho comentado anteriormente, es decir, que a presiones bajas la muestra puede contener todavía pequeñas burbujas de aire en disolución y este hecho hace que las medidas del tiempo de vuelo tengan mayor error experimental. Como se trata de un error sistemático y que no es posible evitar, puesto que el aire se encuentra en equilibrio con el agua, se han eliminado una serie de puntos a presiones bajas.

Para el ajuste de las derivadas del tiempo de vuelo frente a la presión se ha utilizado la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} \text{Si } (x < x_c) &\Rightarrow y = x_c(m_2 - m_1) + n + m_1x \\ \text{Si } (x > x_c) &\Rightarrow y = n + m_2x \end{aligned} \quad \text{Ecuación 4.9}$$

donde  $m_1$  y  $m_2$  son las pendientes de las regiones de baja presión y de alta presión, respectivamente,  $n$  es la ordenada en el origen de la recta de alta presión,  $x$  es la temperatura y  $x_c$  es el punto de corte entre las dos rectas

Además de algunos puntos a baja presión, también se han eliminado otros a alta presión que tienen error experimental, así como a temperaturas negativas, en las que a medida que aumenta la presión la muestra se acerca a la zona de cambio de fase al hielo de alta densidad (ver diagrama de fases del agua Figura 4.21). En la Tabla 4.3 se resumen los intervalos de presión utilizados para el ajuste de cada isoterma, el número de puntos utilizados y la desviación estándar en la temperatura para cada isoterma.

**Tabla 4.3.** Tabla resumen del intervalo de presión utilizado para hacer los ajustes de la derivada del tiempo de vuelo respecto de la presión para cada isoterma, y desviación estándar en la temperatura.

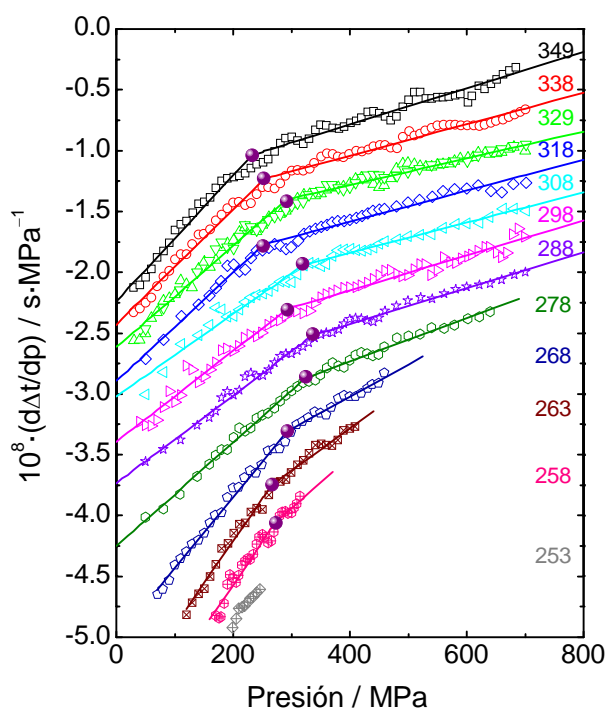
Temperatura K	Desv. Temp. K	Núm. puntos	P <sub>mínima</sub> MPa	P <sub>máxima</sub> MPa
349.31	0.16	66	30.00	683.77
337.94	0.16	68	30.00	700.79
328.66	0.10	68	30.00	700.87
328.13	0.08	47	50.60	701.71
318.12	0.06	47	50.44	701.76
308.13	0.04	47	50.64	701.59
298.35	0.05	67	40.06	699.02
288.11	0.04	47	50.77	700.78
278.12	0.05	44	50.58	640.24
273.09	0.02	50	9.85	499.83
267.86	0.03	40	70.94	459.23
262.73	0.05	30	119.94	409.21
257.63	0.04	30	170.04	314.91

Para determinar los valores de los parámetros de las rectas de ajuste (Ecuaciones 4.13) se han hecho una serie de ajustes en los que en cada uno de ellos se ha seguido un tratamiento matemático diferente con el fin de obtener los mejores resultados posibles. A continuación se presentan los ajustes realizados para las isotermas, especificando en cada uno de ellos los parámetros que se han optimizado.

### Ajuste 0

En este ajuste se han utilizado las trece isotermas de manera global, y con todos los parámetros libres, es decir, que cada isoterma tiene cuatro parámetros libres para su ajuste: punto de corte ( $x_c$ ) de las rectas de baja presión y alta presión, ordenada en el origen de la recta de alta presión ( $n$ ), pendiente de la recta de baja presión ( $m_1$ ) y pendiente de la recta de alta presión ( $m_2$ ).

En la Figura 4.29 se muestran los ajustes obtenidos mediante este método número cero y en la Tabla 4.4 se resumen los resultados obtenidos para los puntos de corte de las dos rectas mediante los ajustes del método cero.



**Figura 4.29.** Ajustes lineales a las isotermas según el método de ajuste 0.

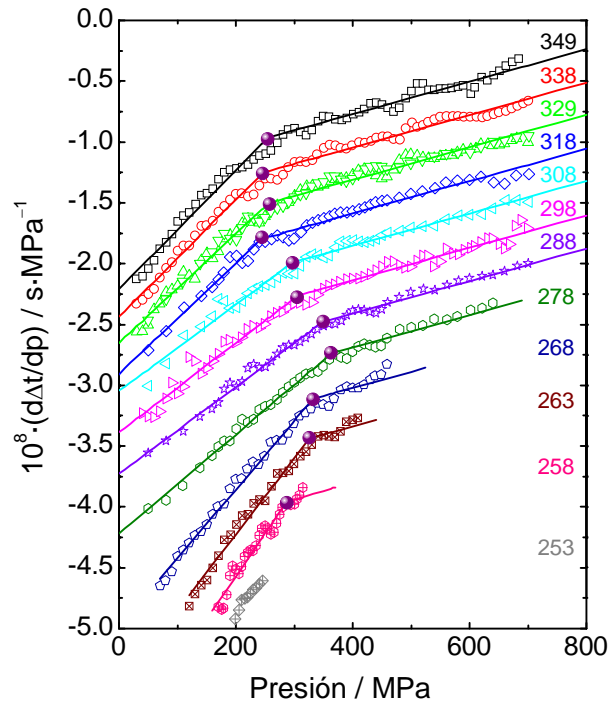
**Tabla 4.4.** Tabla resumen de los valores de las presiones de corte calculadas mediante el ajuste 0.

Temperatura K	Presión ( $x_c$ ) MPa
349.31	232.5
337.94	252.7
328.66	291.8
318.12	251.7
308.13	318.9
298.35	292.6
288.11	336.2
278.12	324.9
267.86	293.2
262.73	266.5
257.63	272.7

### Ajuste 1

En este ajuste se han utilizado las trece isotermas de manera conjunta, y cada isoterma tiene tres parámetros libres: el punto de corte ( $x_c$ ) entre las rectas de baja y alta presión, la ordenada en el origen de la recta de alta presión ( $n$ ), y la pendiente de

la recta de baja presión ( $m_1$ ). El último parámetro, la pendiente de la recta de alta presión ( $m_2$ ), es compartido por todas las rectas y se deja libre. En la Tabla 4.5 se resumen los resultados obtenidos para los ajustes según el método uno



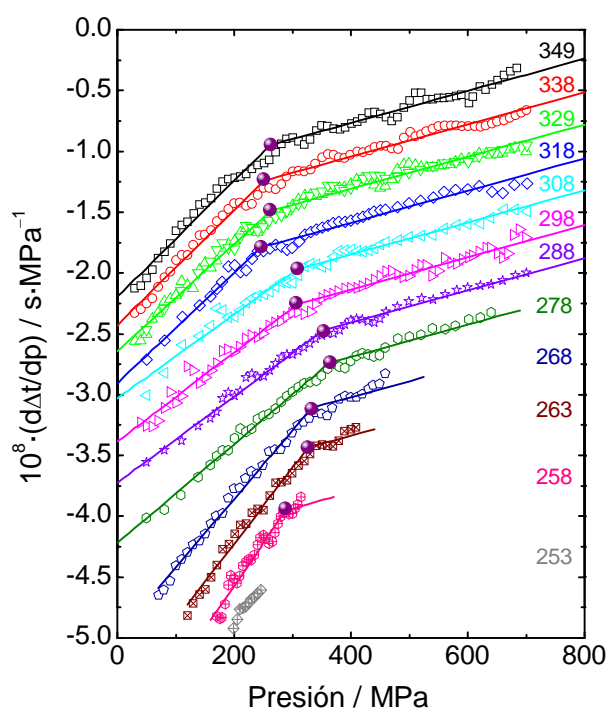
**Figura 4.30.** Ajustes lineales a las isothermas según el método de ajuste 1.

**Tabla 4.5.** Tabla resumen de los valores de las presiones de corte calculadas mediante el método de ajuste 1 para las isothermas estudiadas.

Temperatura	Presión ( $x_c$ )
K	MPa
349.31	246.9
337.94	244.5
328.66	255.8
318.12	243.2
308.13	288.0
298.35	303.3
288.11	347.5
278.12	359.7
267.86	327.9
262.73	325.7
257.63	287.1

## Ajuste 2

En este ajuste se han utilizado las trece isotermas, excepto la de 273.15 K y cada isoterma tiene tres parámetros libres: presión de corte ( $x_c$ ), ordenada en el origen de la recta de alta presión ( $n$ ), y pendiente de la recta de baja presión ( $m_1$ ). La pendiente de la recta de alta presión ( $m_2$ ), es compartido por todas las rectas y se deja libre. En la Tabla 4.6 se resumen los resultados obtenidos para los ajustes.



**Figura 4.31.** Ajustes lineales a las isotermas según el método de ajuste 2.

**Tabla 4.6.** Tabla resumen de los valores de las presiones de corte calculadas mediante el método de ajuste 2 para las isotermas estudiadas.

Temperatura K	Presión ( $x_c$ ) MPa
349.31	262.4
337.94	250.7
328.66	261.7
318.12	245.4
308.13	307.7
298.35	306.4
288.11	353.1
278.12	363.6
267.86	332.2
262.73	326.0
257.63	287.2



### Ajuste 3

Este ajuste se ha realizado de manera global utilizando las isothermas desde 278.15 K a 348.15, compartiendo la misma pendiente ( $m_2$ ) en la zona de alta presión. Para el resto de isothermas se ha fijado esa pendiente y se han ajustado el resto de parámetros, es decir: punto de corte ( $x_c$ ) entre las rectas de baja y alta presión, ordenada en el origen de la recta de alta presión ( $n$ ), y pendiente de la recta de baja presión ( $m_1$ ).

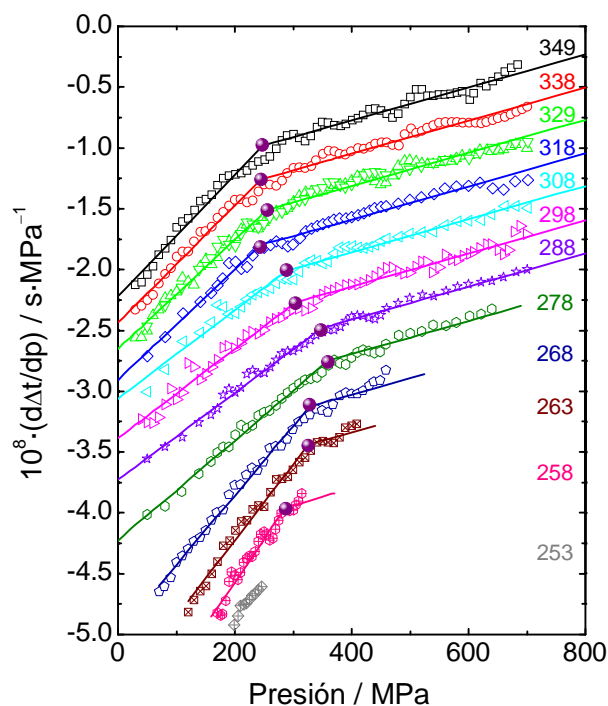


Figura 4.32. Ajustes lineales a las isothermas según el método de ajuste 3.

En la Tabla 4.7 se resumen los resultados obtenidos para los ajustes del método tres.

**Tabla 4.7.** Tabla resumen de los valores de las presiones de corte calculadas mediante el método de ajuste 3 para las isotermas estudiadas.

Temperatura K	Presión ( $x_c$ ) MPa
349.31	255.1
337.94	246.2
328.66	257.5
318.12	244.7
308.13	297.3
298.35	305.4
288.11	349.6
278.12	363.1
267.86	332.0
262.73	325.9
257.63	287.2

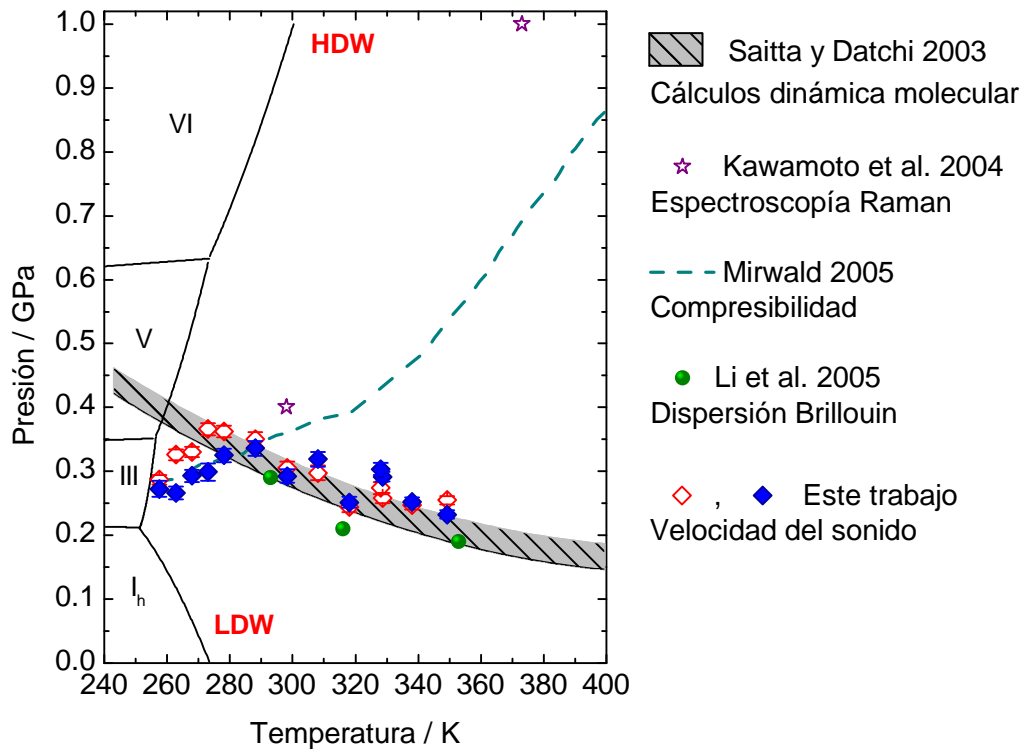
En la Tabla 4.8 se resumen los valores de las presiones de corte,  $x_c$ , obtenidas mediante los cuatro métodos de ajuste utilizados.

**Tabla 4.8.** Resumen de los valores de las presiones de corte,  $x_c$ , para los cuatro métodos de ajuste.

Temperatura K	Presión de corte ( $x_c$ ) / MPa			
	Ajuste 0	Ajuste 1	Ajuste 2	Ajuste 3
349.31	232.5	246.9	262.4	255.1
337.94	252.7	244.5	250.7	246.2
328.66	291.8	255.8	261.7	257.5
318.12	251.7	243.2	245.4	244.7
308.13	318.9	288.0	307.7	297.3
298.35	292.6	303.3	306.4	305.4
288.11	336.2	347.5	353.1	349.6
278.12	324.9	359.7	363.6	363.1
267.86	293.2	327.9	332.2	332.0
262.73	266.5	325.7	326.0	325.9
257.63	272.7	287.1	287.2	287.2

Una vez que se han hecho los ajustes de la derivada del tiempo de vuelo respecto a la presión, se representa el punto de corte en un diagrama de fases del

agua. En la Figura 4.33 se representa un diagrama de fases del agua con los valores obtenidos así como los obtenidos mediante otras técnicas recogidos de la bibliografía.



**Figura 4.33.** Diagrama de fases del agua. (◇, ◆) este trabajo velocidad del sonido, (☆) Kawamoto y col.<sup>50</sup>, Espectroscopía Raman, (---) Mirwald<sup>54</sup> Compresibilidad, (●) Li y col.<sup>51</sup>, dispersión Brillouin, (▨) Saitta y Datchi<sup>44</sup>, dinámica molecular.

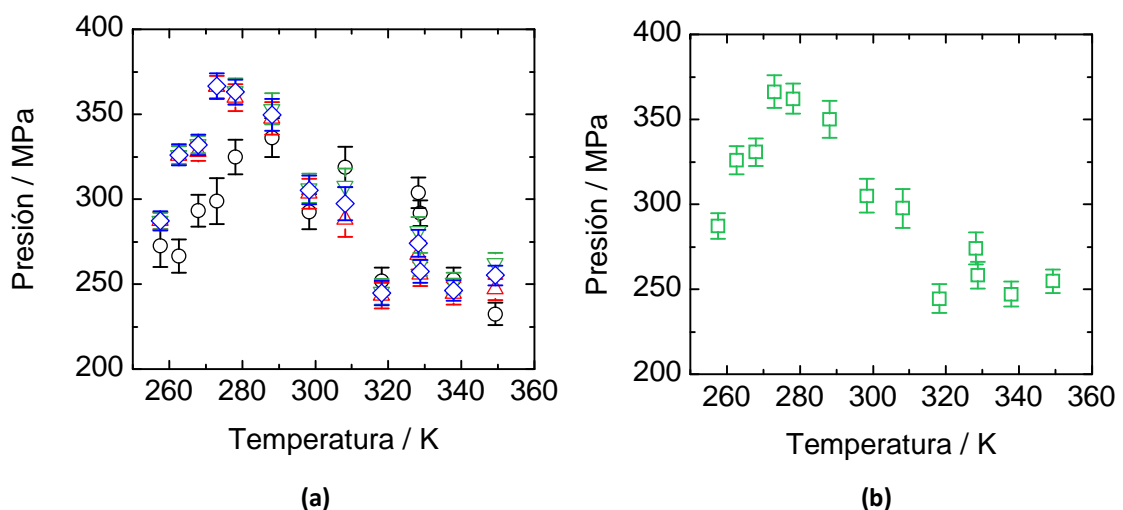
Se puede ver cómo los resultados obtenidos a temperaturas por encima de 273.15 K presentan un buen acuerdo con los resultados propuestos mediante cálculos teóricos mediante dinámica molecular de Saitta y Datchi<sup>44</sup>, así como con los resultados presentados por Li y colaboradores<sup>51</sup> mediante dispersión Brillouin.

A temperaturas por debajo de 273.15 K los resultados obtenidos en este trabajo de tesis difieren con los propuestos por Saitta y Datchi, puesto que éstos afirman que la transición del agua de baja densidad (LDW) al agua de alta densidad (HDW) tiene una pendiente negativa con la temperatura. Los resultados obtenidos mediante medidas de velocidad del sonido para la transición LDW → HDW indican una pendiente positiva y presenta un máximo en torno a 273.15 K. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mirwald mediante medidas de compresibilidad para esta región de temperaturas por debajo de 273.15 K.

- **Variación de los parámetros de ajuste con la temperatura**

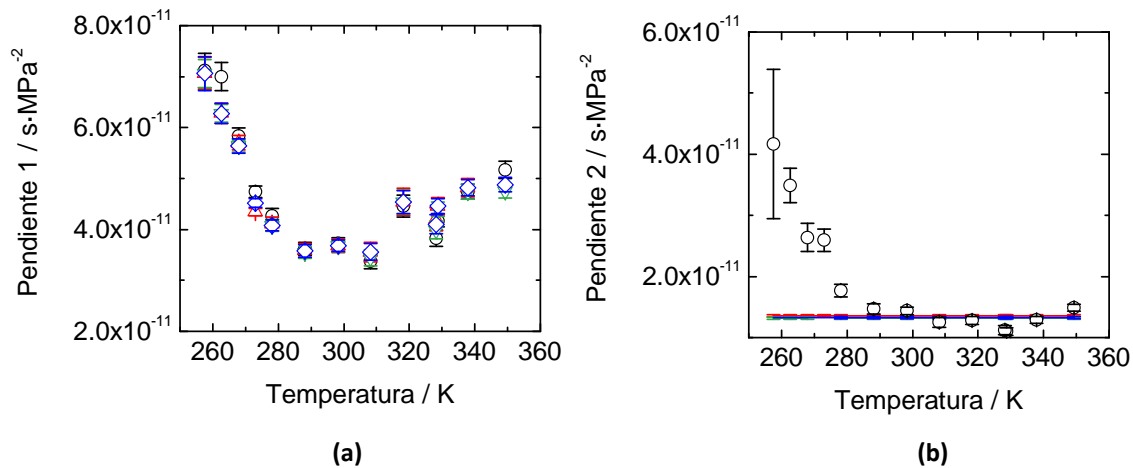
En este apartado se representan los parámetros obtenidos mediante los diferentes ajustes en función de la temperatura con objeto de analizar su dependencia con la temperatura.

En la Figura 4.34 se representan los valores de las presiones de corte,  $x_c$ , de las rectas de baja y alta presión obtenidas para los distintos ajustes llevados a cabo. En la figura se puede ver cómo al principio, al aumentar la temperatura, los resultados presentan una pendiente positiva hasta llegar a una temperatura alrededor de 273.15 K donde presentan un máximo. A partir de este valor, la tendencia cambia y pasan a tener una pendiente negativa, ligeramente inferior en valor absoluto al tramo anterior, que se va suavizando al aumentar la temperatura, siendo prácticamente constante a partir de 320.15 K. En la Figura 4.34.(b) se representa el valor medio de los parámetros obtenidos. El error en la presión oscila entre 20 y 40 MPa.



**Figura 4.34.** Resumen de los valores de las presiones de corte obtenidas mediante los cuatro métodos de ajuste. **(a)** (○) No comparten nada, (△) Comparten la pendiente de la recta de alta presión, (▽) comparten la pendiente de la recta de alta presión pero no incluye la isoterma de 273 K, (◇) En las isotermas de 348-278 K comparten la pendiente de la recta de alta presión, y para el resto se utiliza este valor que está fijado **(b)** (□) Media de todos los valores obtenidos en los ajustes globales compartiendo la pendiente.

También resulta interesante estudiar cómo varía la pendiente de las rectas de baja y alta presión, pendientes 1 y 2 respectivamente. En la Figura 4.35 se muestra esta representación para los diferentes ajustes llevados a cabo.

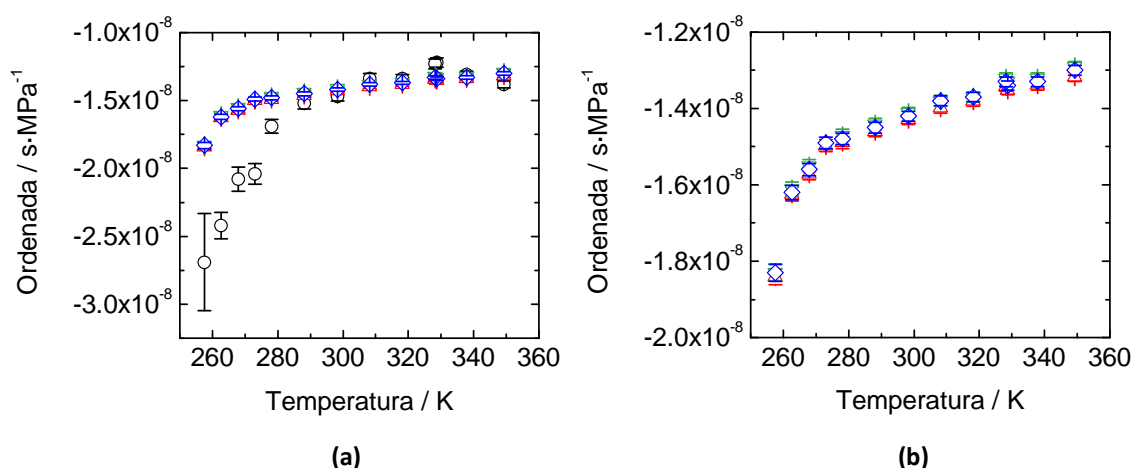


**Figura 4.35.** Representación de las pendientes obtenidas mediante los ajustes realizados en función de la temperatura. **(a)** (○) No comparten nada, (△) Comparten la pendiente de la recta de alta presión, (▽) comparten la pendiente de la recta de alta presión pero no incluye la isoterma de 273.15 K, (◇) En las isotermas de 348.15 – 278.15 K comparten la pendiente de la recta de alta presión, y para el resto se utiliza este valor que está fijado **(b)** (○) No comparten nada, (–) comparten la pendiente de la zona de alta presión, (–) comparten la pendiente de la zona de alta presión, pero no incluye la isoterma de 273.15 K, (–) En las isotermas de 348.15 – 278.15 K comparten la pendiente de la zona de alta presión, y para el resto se utiliza este valor que queda fijado.

En la figura se puede ver cómo la pendiente 1 (pendiente de la zona de baja presión) disminuye rápidamente con la temperatura hasta 278.15 K aproximadamente, donde se mantiene prácticamente constante en el intervalo de temperatura de 278.15 – 318.15 K. A partir de 318.15 K y hasta la temperatura final de los experimentos, 348.15 K, la pendiente aumenta de nuevo, aunque con una tasa de crecimiento menor que con la que disminuyó a temperaturas menores.

En el caso de la pendiente 2, la correspondiente a la zona de alta presión, parece que ésta disminuye con una caída exponencial hasta 328.15 K, y para los dos últimos experimentos, 338.15 y 348.15 K aumenta ligeramente.

Por último en la Figura 4.36 se representa la ordenada en el origen,  $n$ , de la recta de alta presión. En la figura de la izquierda se puede ver en el caso en el que las rectas no comparten nada (ajuste 0, símbolo ○), cómo la ordenada en el origen sigue una tendencia logarítmica, es decir, que crece muy rápidamente en la región de temperaturas bajas y después el crecimiento es muy lento a partir de 318.15 K aproximadamente. En el caso del resto de ajustes, los resultados son muy similares entre sí, y en la parte de la derecha se ha hecho una ampliación para estos ajustes. Observamos un crecimiento rápido del valor de la ordenada en el origen de las rectas de alta presión a temperaturas por debajo de 273.15 K, y a partir de esta temperatura, el crecimiento es más lento.



**Figura 4.36.** Representación de las ordenadas en el origen,  $n$ , frente a la temperatura de las rectas de alta presión para los ajustes realizados. **(a)** (○) No comparten nada, (△) Comparten la pendiente de la recta de alta presión, (▽) comparten la pendiente de la recta de alta presión pero no incluye la isoterma de 273.15 K, (◇) En las isothermas de 348.15 – 278.15 K comparten la pendiente de la recta de alta presión, y para el resto se utiliza este valor que está fijado **(b)** (○) No comparten nada, (△) comparten la pendiente de la zona de alta presión, (▽) comparten la pendiente de la zona de alta presión, pero no incluye la isoterma de 273.15 K, (◇) En las isothermas de 348.15 – 278.15 K comparten la pendiente de la zona de alta presión, y para el resto se utiliza este valor que queda fijado.

#### 4.3.4 Efecto cinético en la transición de fase agua – hielo III y agua – hielo V

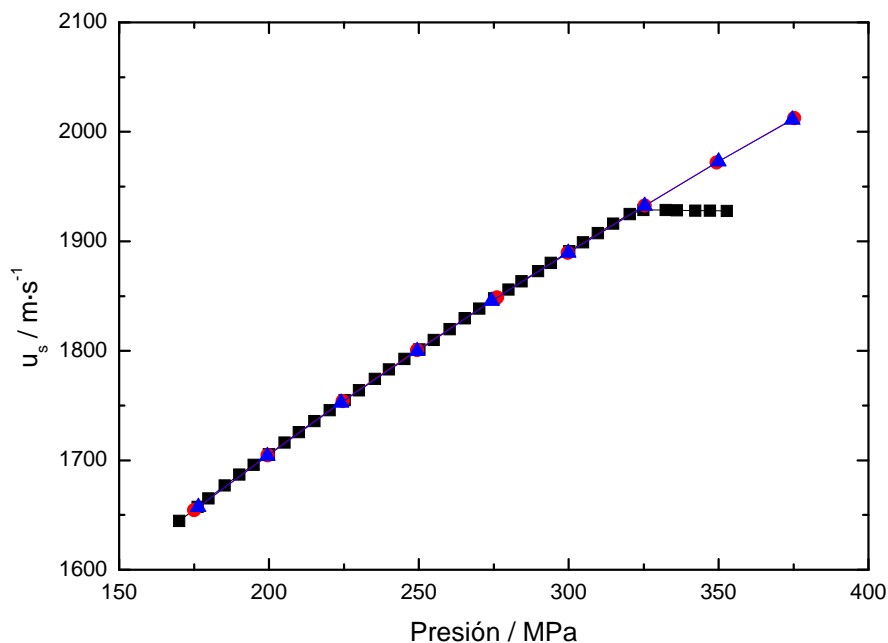
Como se ha mencionado al principio de este apartado de resultados dedicado al agua, se observó un fenómeno cinético en el cambio de fase desde la fase líquida a la fase sólida de los hielos III y V para temperaturas desde 253.15 a 273.15 K. Este fenómeno cinético consistía en que, para una misma temperatura, dependiendo de qué incremento de presión se hiciera en el experimento, la muestra de agua cambiaba de fase a una presión inferior a la que aparece en el diagrama de fases.

Por ejemplo, para la isoterma de 258.15 K se hicieron tres experimentos como aparece en la Tabla 4.1. Dos de estos experimentos se hicieron con un incremento de presión de 25 MPa en el intervalo de 175 a 350 MPa y un tercer experimento cada 5 MPa desde 170 a 350 MPa. En este último caso, el experimento cada 5 MPa, se emplearon cinco horas y cuarto en hacer todo el barrido de presión, sin contar el tiempo previo de equilibrado de la temperatura hasta 258.15 K. En el caso de los dos experimentos cada 25 MPa, se tardó una hora y media en cada uno de ellos, sin contar el tiempo previo hasta que la muestra alcanzara la temperatura de trabajo.

Al observar los resultados de esta isoterma se puede apreciar un comportamiento distinto en el tiempo de vuelo y por tanto de la velocidad del sonido, dependiendo de cómo se haya hecho el experimento, cada 5 MPa o cada 25 MPa. En el caso en el que se ha utilizado un gradiente de compresión de 5 MPa, no fue posible

llegar hasta 375 MPa como en el caso en el que se utilizó un gradiente de 25 MPa porque la muestra de agua se congelaba a presiones por debajo de las establecidas en el diagrama de fases del agua. Este hecho se puede observar en el cambio de curvatura que sufre el tiempo de vuelo y, por consiguiente, la velocidad del sonido, y a que la presión aumentaba bruscamente en el interior del cilindro portamuestras como consecuencia de que estaba ocurriendo un cambio de fase en su interior.

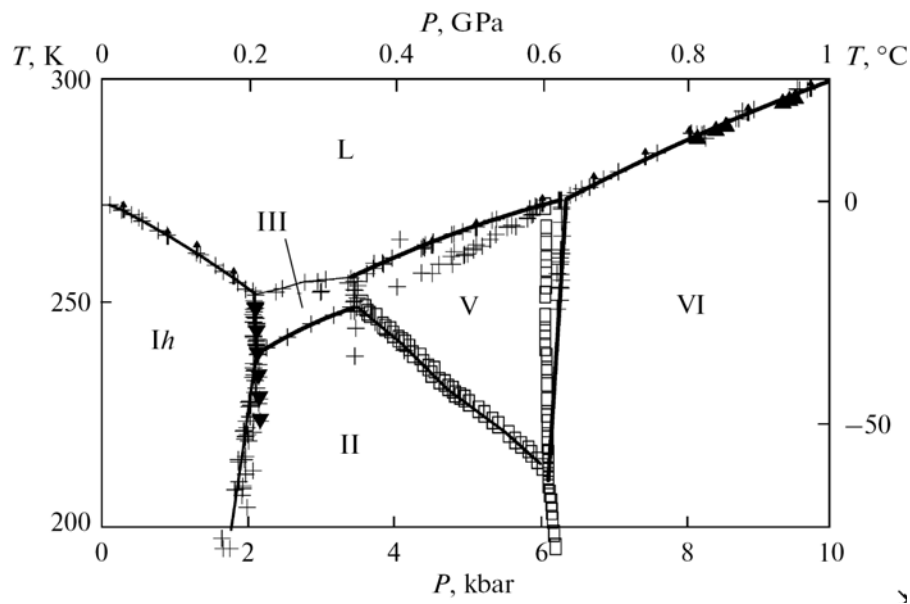
En la Figura 4.37 vemos este hecho. Para el experimento n1, a partir de 325 MPa la velocidad del sonido se mantiene constante debido a que ha ocurrido un cambio de fase en la muestra.



**Figura 4.37.** Variación de la velocidad del sonido con la presión para los tres experimentos realizados a 258.15 K. (■) Experimento n1, (●) Experimento n2, (▲) Experimento n3.

Este mismo fenómeno también se ha observado a 263.15, 268.15 y 273.15 K.

En la bibliografía se pueden encontrar discrepancias a la hora de delimitar las líneas de cambio de fase entre el líquido y el hielo III y entre el líquido y el hielo V. Así por ejemplo, Bridgman<sup>68</sup> (+) propone dos líneas diferentes que delimitan la zona de hielo III como se puede observar en la Figura 4.37. Lo mismo ocurre en otra región del diagrama de fases del agua, fuera del estudio de esta tesis, entre el hielo V y el hielo VI con los trabajos de Bridgman<sup>68</sup> y Dubrovinskaia y Dubrovinsky.<sup>69</sup>



**Figura 4.38.** Ampliación del diagrama de fases en la zona de bajas temperaturas estudiadas en la tesis. (+) Bridgman,<sup>68</sup> (□) Dubrovinskaia y Dubrovinsky.<sup>69</sup>

#### 4.4 Resumen y conclusiones

- Se han realizado medidas de velocidad del sonido en agua mediante transmisión de ultrasonidos a lo largo de trece isotermas en el intervalo de temperatura desde 253.15 K hasta 348.15 K y en el intervalo de presión dentro de la fase líquida hasta un máximo de 700 MPa.
- Se han comparado los resultados obtenidos en esta tesis con los publicados en la bibliografía por otros autores medidos con otras técnicas a las temperaturas a las que existen datos publicados.
- La desviación sistemática de los datos a partir de cierta presión nos hace pensar que la ecuación IAPWS-95 falla a partir de presiones del orden de unos 300 MPa. La alta reproducibilidad y precisión de nuestras medidas para todas las temperaturas y presiones apoya esta teoría.
- La utilización de las medidas de velocidad del sonido en un intervalo de temperaturas tan amplio nos ha permitido definir con una alta precisión la transición entre el agua de baja densidad, LDW, y alta densidad, HDW.
- La barrera energética que hay que superar para que se produzca el cambio en la organización y el índice de coordinación entre estas dos formas de agua líquida, LDW y HDW, presenta un comportamiento anómalo. En primer lugar la barrera energética aumenta hasta temperaturas del orden de 280 K, donde



presenta un máximo y a partir de dicha temperatura disminuye de nuevo la barrera energética, es decir, la presión a la que tiene lugar.

- Las medidas de velocidad del sonido a temperaturas por debajo de 273.15 K muestran que la transición entre el agua – hielo III y el agua – hielo V muestran que las líneas de transición de fase podrían no estar bien definidas como defienden otros autores en la bibliografía.

## 4.5 Referencias

- <sup>1</sup> Dyke T.R., Mack K.M., Muentner J.S.; *J. Chem. Phys.* **1977**, 66, 498-510.
- <sup>2</sup> Odutola J. A., Dyke T. R.; *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 5062-5070.
- <sup>3</sup> Walrafen G. E.; *J. Chem. Phys.* **1964**, 11, 3249-3257.
- <sup>4</sup> Narten A., Levy H.; *J. Chem. Phys.* **1971**, 55, 2263-2269.
- <sup>5</sup> Bosio L., Chen S., Teixeira J.; *Phys. Rev. A.* **1983**, 27, 1468-1475.
- <sup>6</sup> Soper A. K.; *Chem. Phys.* **2002**, 258, 121-137.
- <sup>7</sup> Rahman A., Stillinger F.; *J. Chem. Phys.* **1971**, 55, 3336-3359.
- <sup>8</sup> Soper A. K., Phillips, M.G.; *J. Chem. Phys.* **1986**, 107, 47-60.
- <sup>9</sup> Chau P.; Hardwick A.; *Mol. Phys.* **1998**, 93, 511-518.
- <sup>10</sup> Errington J., Debenedetti P.; *Nature.* **2001**, 409, 318-321.
- <sup>11</sup> Medvedev N., Naberukhin Y.; *J. Non-Cryst. Solids.* **1987**, 94, 402-406.
- <sup>12</sup> Smolin N., Daggett V.; *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 6193-6202.
- <sup>13</sup> Svishchev I., Kusalik P.; *J. Chem. Phys.* **1993**, 99, 3049-3061.
- <sup>14</sup> Svishchev I. M., Zassetsky A., Kusalik P.; *J. Chem. Phys.* **2000**, 258, 181-186.
- <sup>15</sup> Soper A., Ricci M.; *Physica B.* **2000**, 276, 12-16.
- <sup>16</sup> Walrafen G. E., Monosmith W. B.; *J. Chem. Phys.* **1984**, 81, 669-673.
- <sup>17</sup> Röntgen W.K.; *Ann. Phys.* **1982**, 45, 91-97.
- <sup>18</sup> Watts R. O., McGee I. J.; *Liquid State Chemical Physics*, Wiley, New York, **1976**.
- <sup>19</sup> Angell C. A., Rodgers V.; *J. Chem. Phys.* **1984**, 80, 6245-6252.
- <sup>20</sup> Haggis G. H., Hasted J. B., Buchanan T. J.; *J. Chem. Phys.* **1952**, 20, 1452-1465.

- <sup>21</sup> Nemethy G., Scheraga H. A.; *J. Chem. Phys.* **1962**, 36, 3382-3400.
- <sup>22</sup> Walrafen G. E.; "In Hydrogen-Bonded Solvent System" (Eds.: A.K. Covington, P. Jones), Taylor and Francis, London, **1968**.
- <sup>23</sup> Stanley H. E., Teixeira J.; *J. Chem. Phys.* **1980**, 73, 3404-3423.
- <sup>24</sup> Frank H. S.; Wen W.Y.; *Discuss. Faraday Soc.* **1957**, 24, 133.
- <sup>25</sup> Nemethy G., Scheraga H.; *J. Chem. Phys.* **1962**, 36, 3382-3400.
- <sup>26</sup> Werner P., Nordlund D., Bergmann U., Cavalleri M., Odelius M., Ogasawara H., Naslund L., Hirsch T. K., Ojamae L., Glatset P., Pettersson L. G., Nilsson A.; *Science*, **2004**, 304, 995-999.
- <sup>27</sup> Smith J., Cappa C., Wilson K., Messer B., Cohen R., Saykally R.; *Science*, **2004**, 306, 851-853.
- <sup>28</sup> Angell C. A.; *Plenum*. **1972**, 7.
- <sup>29</sup> Zheleznyi B. V.; *Russ. J. Phys. Chem.* **1969**, 43, 1311.
- <sup>30</sup> Zheleznyi B. V.; *Russ. J. Phys. Chem.* **1968**, 42, 950-952.
- <sup>31</sup> Angell C. A., Kanno H.; *Science*. **1976**, 193, 1121-1122.
- <sup>32</sup> Mon K. K., Ashcroft N. W., Chester G. V.; *Phys. Rev. B*. **1979**, 19, 5103-5122.
- <sup>33</sup> Fine R. A., Millero F. J.; *J. Chem. Phys.* **1973**, 59, 5529-5536.
- <sup>34</sup> Speedy R. J., Angell C. A.; *J. Chem. Phys.* **1976**, 65, 851-858.
- <sup>35</sup> Angell C. A., Shuppert, J., Tucker J. C.; *J. Chem. Phys.* **1973**, 77, 3092-3099.
- <sup>36</sup> Angell C. A., Oguni M., Sichina W. J.; *J. Chem. Phys.* **1982**, 86, 998-1002.
- <sup>37</sup> Prielmeier F. X., Lang E. W., Speedy R. J., Lüdemann H.-D.; *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1988**, 92, 1111-1117.
- <sup>38</sup> Osipov Y. A., Zheleznyi B. V., Bondarenko N. F.; *Zh. Fiz. Khim.* **1977**, 51, 1264.
- <sup>39</sup> Paschek D., Geiger A.; *J. Phys. Chem. B*. **1999**, 103, 4139-4146.
- <sup>40</sup> Bertolini D., Cassettari M., Salvetti G.; *J. Chem. Phys.* **1982**, 76, 3285-3290.
- <sup>41</sup> Lang E., Lüdemann H. D.; *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1981**, 85, 603-611.
- <sup>42</sup> Blokzij W., Engberts J. B. E. N.; *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1610-1648; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1545-1573.

- <sup>43</sup> Soper A. K., Ricci M. A.; *Phys. Rev. Lett.* **2000**, 84, 2881.
- <sup>44</sup> Saitta A. M., Datchi F.; *Phys. Rev. E.* **2003**, 67, 020201(R).
- <sup>45</sup> Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R. W., Klein M. L.; *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 926.
- <sup>46</sup> Hura G., Sorenson J. M., Glaeser R. M., Head-Gordon T.; *J. Chem. Phys.* **2000**, 113, 9140.
- <sup>47</sup> Okhulkov A. V., Demianets Y. N., Gorbaty Y. E.; *J. Chem. Phys.* **1994**, 100, 1578.
- <sup>48</sup> Finney J. L., Hallbrucker A., Kohl I., Soper A. K., Bowron D. T.; *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 88, 225503.
- <sup>49</sup> Canpolat M., Starr F. W., Scala A., Sadr-Lahijany M., Mishima O., Havlin S., Stanley H.E.; *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 294, 9.
- <sup>50</sup> Kawamoto T., Ochiai S., Kagi H.; *J. Chem. Phys.* **2004**, 120, 5867.
- <sup>51</sup> Li F., Cui Q., He Z., Cui T., Zhang J., Zhou Q., Zou G.; *J. Chem. Phys.* **2005**, 123, 174511.
- <sup>52</sup> Maisano G., Migliardo P., Aliotta F., Vasi C., Wanderlingh F., D'Arrigo G.; *Phys. Rev. Lett.* **1989**, 93, 942.
- <sup>53</sup> Grimsditch M., Popota S., Polian A.; *J. Chem. Phys.* **1996**, 105, 8801.
- <sup>54</sup> Mirwald P. W.; *J. Chem. Phys.* **2005**, 123, 124715.
- <sup>55</sup> Haar L., Gallagher J. S., Kell G. S.; *NBS/NRS Steam Tables*. **1984**.
- <sup>56</sup> Bridgman P. W.; *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* **1935**, 70, 285.
- <sup>57</sup> Mirwald P. W.; *Mitt. Österr. Mineral. Ges.* **2001**, 146, 193.
- <sup>58</sup> Bridgmann P.W.; *Proc. Am. Acad. Arts. Sci.* **1912**, 47, 441.
- <sup>59</sup> Wagner W., Pruß A. J.; *Phys. Chem. Ref. Data* **2002**, 31, 387-535.
- <sup>60</sup> Wilson W. D.; *J. Acoust. Soc. Am.* **1959**, 31, 1067-1072.
- <sup>61</sup> Holton G., Hagelberg M. P., Kao S., Johnson Jr. W. H.; *J. Acoust. Soc. Am.* **1968**, 43, 102-107.
- <sup>62</sup> Del Grosso V. A., Mader C. W.; *J. Acoust. Soc. Am.* **1972**, 52, 1442-1146.
- <sup>63</sup> Mamedov A. M.; *Inzh. Fiz. Zh.* **1979**, 36 (1), 156-160.

<sup>64</sup> Petit J. P., Tufeu R., Le Neindre B.; *Int. J. Thermophys.* **1983**, 4, 35-50.

<sup>65</sup> Fujii K., Masui R.; *J. Acoust. Soc. Am.* **1993**, 93, 276-282.

<sup>66</sup> Fujii K.; *12th Symposium on Thermophysical Properties, Boulder, Colorado, USA*, **1994**.

<sup>67</sup> Vance S., Brown J. M.; *J. Acoust. Soc. Am.* **2010**, 127, 174-180.

<sup>68</sup> Bridgman P. W.; *Proc. Amr. Acad. Arts Sci.* **1911**, 47, 441-558.

<sup>69</sup> Dubrovinskaia N., Dubrovinsky L.; *Rev. of Sci. Instrum.* **2003**, 74, (7), 3433-3437.



# ***CAPÍTULO 5***

## ***ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN DEL DODECANOATO DE SODIO EN AGUA***

---

### **5.1 Introducción**

Este capítulo está dedicado al estudio de la agregación del dodecanoato de sodio ( $C_{12}H_{23}O_2Na$ , también conocido como laurato de sodio, o por su abreviatura NaL) en agua. Se trata de un sistema sencillo, formado por una molécula tensioactiva capaz de formar agregados micelares, de uso habitual en la industria. El objetivo de este estudio ha sido caracterizar la agregación del dodecanoato de sodio en agua en función de la concentración, la temperatura y la presión. Para ello, se empleó la técnica de ultrasonidos: primero, a presión atmosférica, principalmente para validar la metodología y luego, a alta presión, para obtener información original sobre el comportamiento de este sistema. Estos resultados permitirán abordar sistemas micelares más complejos de interés en otras áreas de conocimiento como las caseínas en ciencia y tecnología de alimentos (Capítulo 6).

En primer lugar se hará una breve introducción sobre los sistemas micelares, su estructura y sus propiedades características, como es la concentración micelar crítica. Posteriormente, se comentarán los aspectos particulares de la metodología llevada a cabo para el estudio de este sistema. En último lugar, se mostrarán los resultados

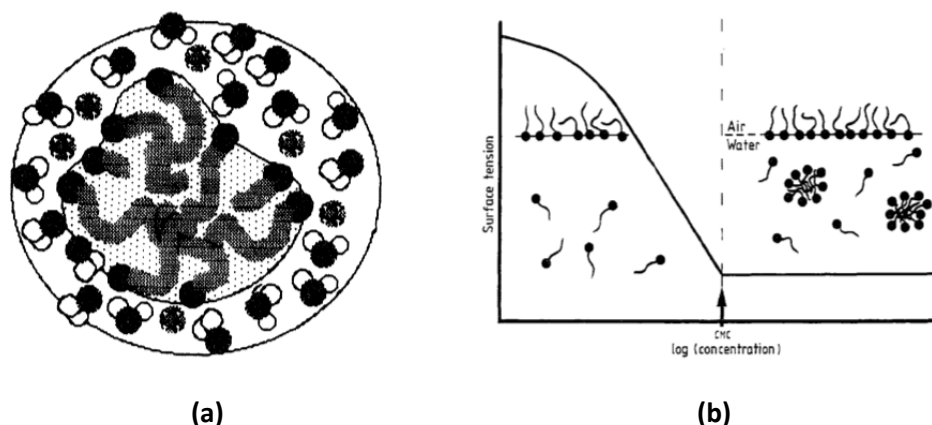
obtenidos separados en tres grandes bloques: el primero dedicado a la validación de la metodología, el segundo al efecto de la temperatura sobre la formación de micelas, y el tercero dedicado al efecto de la presión. Se concluirá a partir de todos ellos, sobre el papel del agua en la agregación del dodecanoato de sodio.

### 5.1.1 Formación de agregados

- **Aspectos generales**

Una molécula de tensioactivo contiene una cadena alifática que tiene carácter apolar o hidrofóbico y una cabeza con un grupo polar o hidrofílico. Según las características de carga del grupo polar en agua, los tensioactivos se clasifican en catiónicos (carga positiva), aniónicos (carga negativa), no iónicos (sin carga neta) y zwitteriónicos o anfóteros (carga global nula a pH igual al de su punto isoelectrico). Esta estructura hace que estas moléculas sean capaces de reducir la tensión interfacial entre dos superficies en contacto, de ahí el nombre por el que también son conocidos, surfactante, designación proveniente de la contracción de las palabras inglesas “*surface active agents*”. Estas sustancias tienen un gran interés tecnológico, puesto que están presentes en los detergentes y emulsiones de uso cotidiano, y participan de manera esencial en numerosas formulaciones de interés farmacológico, cosmético, etc., así como en la tecnología de alimentos y en procesos biológicos. Por ejemplo, en tecnología de alimentos se utilizan para modular la textura de un alimento al formar productos de distintas viscosidades (desde líquidos a geles sólidos). También permiten estabilizar suspensiones (cremas, preparaciones crudas), emulsiones (mahonesa, salsas) y espumas (mousses, chantillí, merengue). El efecto buscado puede ser a nivel del procesado para facilitarlo y/o conseguir mejorar las características de calidad del producto obtenido, o bien, a nivel del consumo para alargar la vida útil del producto.<sup>1</sup>

Las propiedades tecnológicas de las disoluciones de tensioactivos dependen en gran medida de la concentración en la disolución y de las características del propio tensioactivo. Según la concentración y la clase de tensioactivo (entre otros factores) encontramos agregados con distintas estructuras. El agregado más simple es la micela, que se ha representado esquemáticamente en la Figura 5.1. En este capítulo, nos centraremos en el estudio de esta clase de agregado: las micelas.



**Figura 5.1. (a)** Representación esquemática de una micela: la región interna está formada por las cadenas hidrofóbicas desordenadas y la capa exterior contiene los grupos de las cabezas polares, los contraiones y las moléculas de agua. **(b)** Variación de la tensión superficial con la concentración para una disolución acuosa de tensioactivo. Figuras tomadas de la Ref. [2].

El término micela se usa para designar una entidad de dimensiones coloidales, en equilibrio dinámico con el monómero que da lugar a su formación. Una disolución micelar es una dispersión de moléculas de tensioactivo, en agua o en un disolvente apolar, con un tamaño característico. En disoluciones acuosas se habla de micelas, mientras que la agregación micelar en disolventes apolares ocurre en las denominadas micelas inversas. La capacidad de las disoluciones micelares para disolver solutos hidrofóbicos (en el caso de las micelas inversas para disolver agua) es lo que confiere a estos sistemas propiedades tan interesantes. Las aplicaciones tecnológicas de las micelas son numerosas. Podemos citar, como ejemplos en el campo de los alimentos, el uso de caseínas para encapsular nutrientes dentro de las micelas formadas, o el uso de lecitinas para formar micelas alrededor de las gotas de aceite y así mantenerlas dispersas en la fase acuosa.

- **Mecanismos de formación y estructura de una micela**

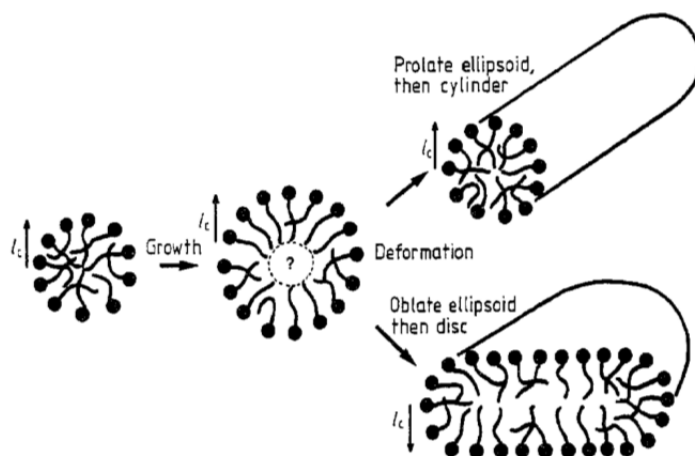
La autoasociación de los tensioactivos resulta de su carácter hidrofóbico y de las repulsiones de largo alcance entre sus partes hidrofílicas. El primero busca disminuir al máximo el contacto de la parte apolar del tensioactivo con el agua mientras que las segundas prohíben la separación completa de fases. De esta manera, el contacto de las partes hidrófobas entre sí está favorecido. El balance entre estas fuerzas opuestas de diferente alcance espacial conduce a la agregación. Estas dos contribuciones en la energía de formación de las micelas son grandes y opuestas, y pequeñas variaciones son muy importantes y tienen grandes consecuencias estructurales produciendo, por tanto, diferentes estructuras, lo que permite observar un polimorfismo estructural muy rico.<sup>3</sup>



La formación de cualquier agregado en una disolución de tensioactivo está restringida por el impedimento estérico y por el coste energético de mezclar el hidrocarburo y el agua. Debido al balance de estos dos términos grandes y opuestos, se produce una separación clara entre las partes hidrofóbicas e hidrofílicas adyacentes, dando lugar a la formación del agregado. En las regiones hidrofóbicas éstas se encuentran libres de las partes hidrofílicas de las moléculas. Además, también se ha concluido que en las micelas el centro está formado por cadenas hidrocarbonadas en donde el agua está ausente.<sup>4</sup>

La consecuencia importante de la combinación de las interacciones atractivas de van der Waals de largo alcance y las repulsivas de corto alcance es que, a cada concentración, la densidad del sistema tensioactivo-agua es constante, incluso en unas pocas distancias moleculares. Las discrepancias con respecto a este comportamiento se pueden considerar como defectos, como en el estado sólido, y suponen un coste energético.

Debido a su área mínima para un determinado volumen, la forma esférica es el mejor modo de minimizar el área de contacto (véase la Figura 5.2). Por lo tanto, se espera que las micelas tengan una forma esférica siempre que sea posible estéricamente. Para evitar los contactos agua-hidrocarburo, el agua es expelida del centro micelar que está compuesto de hidrocarburo seco de densidad constante. Para rellenar el volumen del centro de manera completa, al menos debe estar presente en su centro un grupo metilo y, para las cabezas que están en la superficie, el radio micelar no puede exceder la máxima longitud de una molécula de tensioactivo. Las moléculas esféricas pueden crecer hasta un valor máximo del número de agregación y cualquier crecimiento adicional induce una deformación en su forma como se representa en la Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Límite de esfericidad de una micela. Las micelas más grandes no pueden tener una forma esférica ya que se formaría un agujero en su centro. Figura tomada de la Ref. [2].

### 5.1.2 Influencia de distintos factores en la formación de micelas

Existen diferentes factores capaces de desplazar el equilibrio de las micelas en disolución acuosa. A continuación, vamos a describir el efecto de esos factores sobre la formación de micelas. Nos centraremos en tres factores de interés para esta tesis: la concentración, la temperatura y la presión.

- **Concentración de tensioactivo**

Como ya se ha comentado, la coexistencia en una misma molécula de dos tipos opuestos de comportamiento (hidrofílico e hidrofóbico) es lo que le confiere a la molécula de tensioactivo la capacidad para agregarse espontáneamente en estructuras microscópicas lábiles<sup>2</sup> por encima de una determinada concentración denominada *Concentración Micelar Crítica* (CMC). A bajas concentraciones, el tensioactivo se encuentra en el seno de la disolución en forma de monómeros o formando pequeños agregados (región premicelar) y, a medida que aumenta su concentración, los monómeros comienzan a agregarse formando estructuras más complejas como micelas, bicapas u otras estructuras supramoleculares (región postmicelar).

Son muchas las propiedades físicas del sistema tensioactivo-agua que experimentan cambios notables debido al fenómeno de la agregación micelar, de modo que en la región premicelar el comportamiento del sistema es muy diferente al que se observa en el mismo una vez que se han formado las micelas. Por ejemplo, en la Figura 5.1.b se ha esquematizado la variación de la tensión superficial con la concentración, de manera que a concentraciones inferiores a la CMC la tensión superficial disminuye al aumentar la concentración, mientras que por encima de la CMC apenas varía la tensión superficial.

Habitualmente, la CMC se determina experimentalmente a partir del cambio en la tendencia que se observa en la variación de una propiedad física con la concentración. Así, es común determinar la CMC a partir de la tensión superficial, la conductividad, la intensidad de luz dispersada o, como en el caso de esta tesis, mediante la velocidad del sonido.

Aunque es sabido que el comienzo de la formación de las micelas ocurre en un intervalo de concentraciones, es habitual y conveniente hablar de una única CMC de un tensioactivo. La concentración a la cual las micelas comienzan a ser detectables depende de la sensibilidad de la técnica experimental. El intervalo de concentración en el cual la fracción de soluto adicional que forma micelas cambia de prácticamente cero a casi la unidad depende de varios factores. Estos factores son el número de

monómeros en la micela, la longitud de la cadena del monómero, las propiedades de los contraiones y otros detalles del equilibrio monómero-micela. En los estudios hechos a presión atmosférica se sabe que cuanto más alto sea el valor de la CMC, más ancho es el intervalo de concentración en el que la transición tiene lugar, tanto en valor absoluto como en valor relativo en comparación con la CMC.<sup>4</sup> Los valores de CMC son típicamente de milimolar para tensioactivos iónicos y de micromolar para los no iónicos. Debido a que los diferentes métodos experimentales pueden reflejar la transición premicelar-postmicelar en diferente extensión, son esperables diferencias sistemáticas entre los valores determinados con diferentes técnicas.

Es muy útil conocer la CMC de todo tipo de tensioactivos ya que de sus valores se puede extraer bastante información.<sup>5</sup> La actividad superficial e interfacial de los monómeros anfipáticos está reflejada en el valor de la CMC. Hay, por tanto, una correspondencia excelente entre la adsorción de los monómeros, la capacidad para reducir la tensión superficial o interfacial y el valor de la CMC. Cuanto más activo es superficialmente el monómero, más alta es la tendencia para formar micelas y el valor de la CMC será más pequeño. Debido a que por encima de la CMC la actividad del monómero aumenta sólo muy lentamente, la CMC también es una medida de la concentración a la cual la actividad termodinámica del monómero y, por tanto, su actividad superficial neta y su adsorción a posibles sustratos se estabiliza y alcanza valores constantes. Todo esto explica la importancia de su determinación para ciertos sistemas de amplio uso en la industria.

Como las propiedades de las micelas dependen de las interacciones micela-medio así como de las interacciones micela-micela, para comprender las primeras sin la complicación de las últimas, es necesario extrapolar las propiedades de las micelas a un punto donde las interacciones micela-micela sean despreciables. Para el estudio de las propiedades micelares, la CMC sirve como un punto conveniente para la extrapolación, es decir, es la dilución infinita de las micelas.<sup>2</sup> Además, en medios micelares, el intervalo correspondiente de concentración para el análisis de las interacciones es justo por encima de la CMC.

Por último, en situaciones donde se necesita conocer una estimación de la cantidad o concentración de las micelas, o para saber el efecto de la concentración de micelas en la reactividad de algunos sistemas, la CMC puede usarse para dar una estimación aproximada de la concentración del monómero en la disolución.

En cuanto a la variación de la CMC para los lauratos o dodecanoatos (aniones aquí representados como L) se observa un comportamiento que varía en función del

contraíón aunque no de forma significativa. Sólo se observa un pequeño decrecimiento en la CMC cuando aumenta el tamaño del contraíón.<sup>6</sup>

- **Temperatura**

El aumento de la temperatura tiene distintas consecuencias sobre los tensioactivos iónicos y no iónicos. Para los iónicos, como el dodecanoato de sodio, existe una temperatura, conocida como temperatura de Krafft, por debajo de la cual la solubilidad es algo más baja impidiendo la formación de micelas. Por encima de esta temperatura la solubilidad aumenta enormemente y comienzan a formarse las micelas.

Los no iónicos parecen comportarse de forma distinta. Cuando la temperatura aumenta, se alcanza un punto en el cual los grandes agregados del tensioactivo no iónico, se separan en distintas fases. A esa temperatura se le conoce con el nombre de punto de nube, que normalmente es menos acusado que la temperatura de Krafft.<sup>7</sup>

Por tanto, se puede afirmar que el principal efecto que tiene la temperatura en disoluciones micelares se produce en la solubilidad del surfactante. A bajas temperaturas la solubilidad es muy baja pero ésta aumenta de forma considerable en un intervalo de temperatura relativamente pequeño. Además también se observa que la temperatura de Krafft aumenta enormemente a medida que aumenta la longitud de la cadena hidrocarbonada, y que esta temperatura de Krafft depende en gran medida de la cabeza hidrofílica y el contraíón.

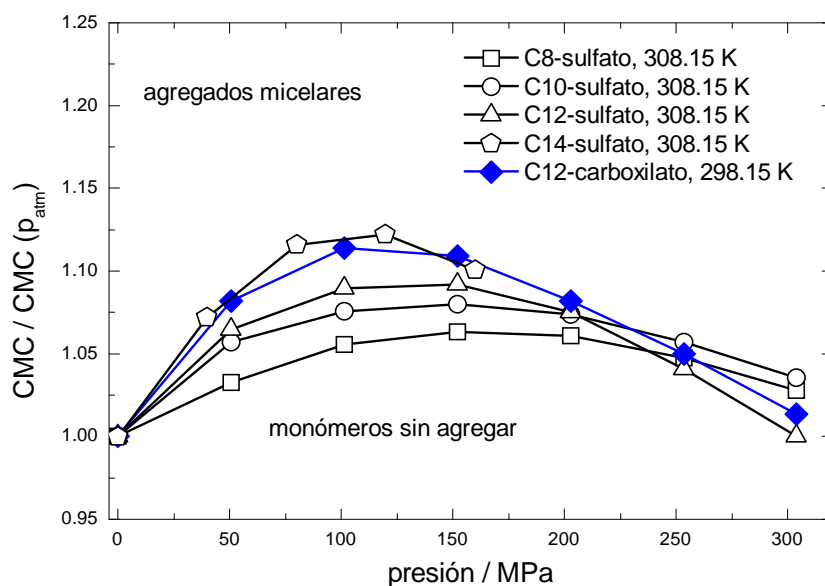
En cuanto a la CMC, en muchos sistemas se observa que ésta disminuye al aumentar la temperatura presentando un mínimo, ya que a más altas temperaturas la CMC se incrementa aumenta con la temperatura. Por ejemplo, la CMC para el NaL y KL disminuye hasta una temperatura de unos 308.15 K, pero la CMC para el dodecanoato de tetrametilamonio ( $\text{Me}_4\text{NL}$ ) aumenta por encima de esa temperatura. Si se representa la variación de entalpía en el estado micelar,  $\Delta H^m$ , frente a la temperatura se aprecia un mínimo para el NaL y el KL, en torno a 300.15 K, pero para el caso del  $\text{Me}_4\text{NL}$  disminuye en todo el intervalo de temperatura estudiado.<sup>7</sup>

Se puede afirmar por tanto, que la temperatura afecta en mayor medida a la solubilidad del tensioactivo, y que el efecto que produce sobre la CMC es pequeño y difícil de cuantificar para una gran parte de tensioactivos.

### • Presión

El efecto de la presión en las disoluciones micelares ha sido muy poco estudiado.<sup>8</sup> Hasta los años 80, los estudios bajo presión realizados con más frecuencia han consistido en analizar las propiedades termodinámicas y la estabilidad de las diferentes fases, mientras que estudios de propiedades microscópicas para analizar la posible modificación con la presión de la estructura micelar han sido menos frecuentes. Los principales métodos usados en los diferentes estudios han consistido en la medida de conductividad eléctrica, compresión volumétrica, velocidad del sonido y dispersión de luz. Por ejemplo, el grupo de los investigadores Vikingstad y Hoiland han realizado un estudio termodinámico sistemático sobre los carboxilatos alquílicos, analizando qué efecto tiene la presión sobre la CMC de las disoluciones acuosas de los mismos y estudiando cómo influyen en dicho comportamiento parámetros tales como la longitud de la cadena hidrocarbonada, los contraiones y la concentración de otro electrolito.<sup>9-12</sup>

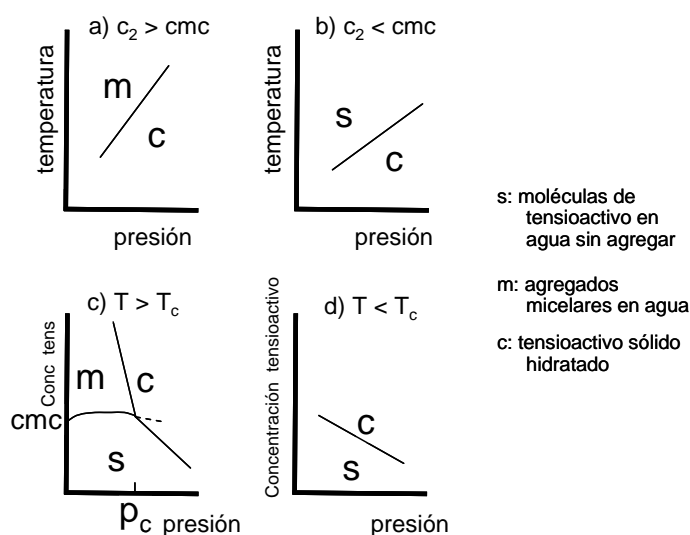
Las observaciones realizadas parecen mostrar que la CMC en función de la presión tiene un máximo a presiones moderadas, en torno a 100-150 MPa. En la Figura 5.3, donde se muestra dicho comportamiento para varios tensioactivos aniónicos, se observa que el máximo valor de la CMC suele ser entre un 6 y un 12 % de la CMC a presión atmosférica. El comportamiento observado implica que la compresión inicial de las micelas causa una disociación de las mismas, mientras que las sucesivas compresiones por encima de cierta presión producen la agregación de los monómeros para formar de nuevo las micelas a presiones superiores a 200 – 300 MPa.



**Figura 5.3.** Variación de la CMC con la presión para varios tensioactivos aniónicos. Datos tomados de las Refs. [10] (para el dodecanoato de sodio) y [12] (para los alquilsulfatos de sodio). Todos los datos están reducidos con el respectivo valor de la CMC a presión atmosférica.

Además de los estudios de la variación de la CMC con la presión y de la curva de solubilidad de las moléculas de monómero en función de la presión, se ha investigado el intervalo de estabilidad de la fase formada por los agregados micelares. Sin embargo, los estudios a altas presiones han estado limitados a bajas concentraciones de tensioactivo, a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente (283.15 - 313.15 K), y a presiones generalmente por debajo de 200 MPa. En la Figura 5.4 se ha esquematizado un diagrama de fases típico. Las curvas de solubilidad y de la CMC dividen a los sistemas tensioactivo-agua en tres regiones: (s) moléculas de monómero del tensioactivo dispersas individualmente, (m) micelas en equilibrio con moléculas de monómero y (c) cristales de moléculas monoméricas hidratados.

Por otro lado, se han realizado un buen número de estudios bajo presión en moléculas anfífilas como los fosfolípidos,<sup>13</sup> revelándose un rico polimorfismo estructural. Uno de los aspectos interesantes de tales estudios radica en que sirven como elementos estructurales básicos de las membranas biológicas. Como se puede observar con los resultados mostrados en la Figura 5.5, los fosfolípidos exhiben a menudo varias transiciones de fase. En este ejemplo, los resultados de difracción de rayos-X y de espectroscopía han permitido analizar las estructuras de las diferentes fases tipo Gel, y en la fase Gel 5 se concluye que las moléculas lipídicas han perdido esencialmente todo el agua hidratante interlamelar, y la fase ahora coexiste con agua sólida en la fase VI.



**Figura 5.4.** Diagrama de fases de un tensioactivo típico iónico cerca de la CMC. La presión crítica,  $p_c$ , y la temperatura crítica,  $T_c$ , se definen como las condiciones de presión y temperatura donde las tres fases representadas (s, m y c) están en equilibrio. La línea discontinua indica el hecho de que las micelas son fácilmente subenfriadas o sobre-presionadas.  $c_2$  representa la concentración de tensioactivo.



Por otra parte, el NaL es una sustancia para la que existen bastantes estudios de sus propiedades fisicoquímicas a presión atmosférica y a diferentes temperaturas en función de la concentración.<sup>14-16</sup> Además, en la mayoría de estos estudios se ha analizado el comportamiento de las diferentes propiedades para carboxilatos con un número de carbonos distinto. Gracias a ello, se tiene información sobre cómo de compactas son las micelas de los diferentes tensioactivos, conociendo cómo influye la longitud de la cadena en los cambios experimentados por las micelas al aumentar la concentración de tensioactivo. Se sabe que para los de cadena más corta lo que sucede es un aumento del tamaño de la micela, mientras que, para cadenas de 10 átomos de carbono o más, como el que nos ocupa en esta tesis, al aumentar la concentración de tensioactivo sólo se incrementa el número de micelas. También existen en la bibliografía datos de la variación de la CMC con la presión aunque sólo hasta 160 MPa para la serie de los carboxilatos.<sup>10-13</sup>

Finalmente, el NaL es un sistema que se puede utilizar como modelo para el estudio posterior de sistemas biológicos más complejos, pero en los que se espera que tengan propiedades de agregación similares. Conocer qué efectos tiene la presión en el fenómeno de agregación en un sistema sencillo como el NaL nos puede ayudar a extrapolar la información a un sistema biológico más complejo como es el que se estudiará en el siguiente capítulo: las micelas de caseínas en disoluciones acuosas de caseinato de sodio y en la leche.

## 5.2 Metodología específica

Para el estudio del NaL se han utilizado dos envases del mismo lote suministrados por la empresa Fluka (número de lote 1278707,  $M_m = 222.299 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , pureza > 98.0%, Suiza).

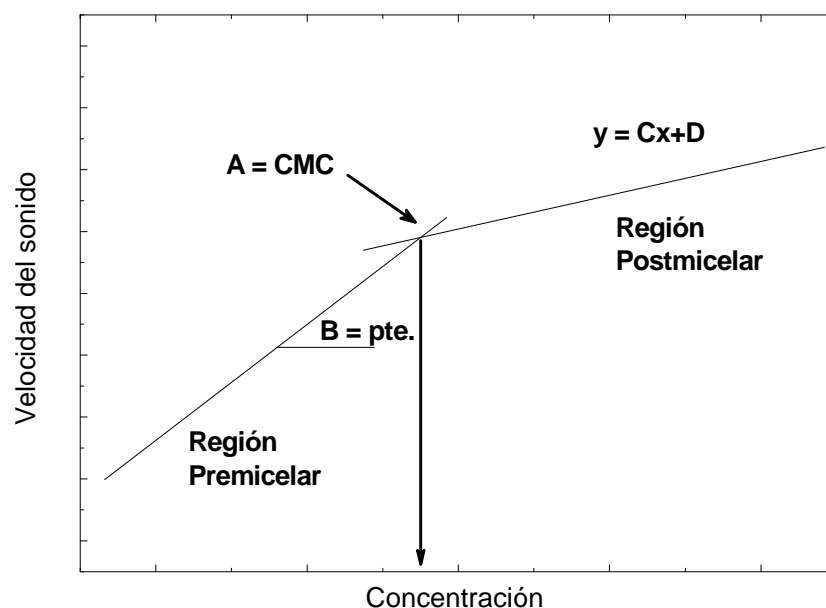
Las disoluciones de trabajo se prepararon usando una balanza con una precisión de 0.01 g (BBI-51, BOECO, Alemania). Esta balanza es lo suficientemente precisa como para pesar las cantidades necesarias para preparar las disoluciones de trabajo. Normalmente se preparó una disolución madre de NaL  $0.1000 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ . A partir de ella se preparaban por dilución el resto de disoluciones. Además, para comprobar la repetitividad de las medidas a alta presión, se prepararon directamente tres disoluciones de la concentración deseada utilizando una balanza analítica con una precisión de 0.0001 g.



A la hora de preparar las disoluciones se tuvo en cuenta el contenido de agua del producto de partida. Este porcentaje de humedad se determinó por termogravimetría. Se pesaron unos gramos de muestra, se introdujo en una estufa a 383.15 K y se pesó al cabo de dos horas, repitiendo el proceso tres veces hasta que se observó que no había pérdida de masa, lo que indicaba que se había eliminado todo el contenido en agua. Así, se determinó que el contenido en agua para el NaL comercial era del 0.6 %.

Las concentraciones de NaL estudiadas fueron desde 0.0050 hasta 0.1000 mol·kg<sup>-1</sup>, para las medidas en función de la temperatura (las concentraciones exactas así como los valores experimentales medidos de densidad y velocidad del sonido se recogen en el Apéndice II) y desde 0.0050 hasta 0.1250 mol·kg<sup>-1</sup> para las medidas en función de la presión. Se hicieron dos series de experimentos, tanto para el estudio del efecto de la temperatura como el de la presión, partiendo cada vez de una disolución madre 0.1000 mol·kg<sup>-1</sup> y preparando el resto por dilución. Una tercera serie de medidas se hizo preparando directamente las concentraciones de 0.0050, 0.0295 y 0.1250 mol·kg<sup>-1</sup> en el caso de las medidas a alta presión. Este conjunto de disoluciones fueron estudiadas a presión atmosférica en función de la temperatura, desde 283.15 hasta 333.15 K. También se estudiaron a 298.15 K en función de la presión, desde 0.1 hasta 700 MPa. Todas las disoluciones se desgasificaron utilizando un baño de ultrasonidos (modelo 3000515 J. P. Selecta S. A., Barcelona, España) con objeto de eliminar la mayor cantidad posible de aire. A continuación, se procedió a medir la velocidad del sonido de acuerdo con el protocolo descrito en el Capítulo 3, sección 3.2.1. para las medidas a presión atmosférica y sección 3.3.2.1. para las medidas a alta presión.

Para el tratamiento de datos, una vez conocida la velocidad del sonido, se utilizó el siguiente procedimiento. Se sabe que la CMC se puede determinar a partir del análisis de la variación de la velocidad del sonido con la concentración, de manera que como se muestra en la Figura 5.7, se observa un cambio de tendencia en la velocidad del sonido a una concentración dada que representa la CMC. Las dos tendencias se pueden ajustar a una variación lineal cada una, y el punto de intersección de ambas rectas indica el valor de la CMC.



**Figura 5.7.** Variación de la velocidad del sonido con la concentración. Ilustración de los parámetros de ajuste utilizados en el algoritmo programado en OriginPro® 8.0.

Para hacer estos ajustes se utilizó el programa de tratamiento de datos OriginPro® 8.0. Para ello se programó el siguiente algoritmo:

```

If (x < A)
     $y = A * (C - B) + D + B * x;$ 
else
     $y = C * x + D;$ 

```

Ecuación 5.1

donde el parámetro  $A$  es el valor de la CMC,  $B$  y  $C$  son las pendientes de las regiones de baja concentración (premicelar) y alta concentración (postmicelar), respectivamente, y el parámetro  $D$  es la ordenada en el origen correspondiente a altas concentraciones. En la Figura 5.7 se muestra un esquema en el que se indican gráficamente el significado de los diferentes parámetros de ajuste.

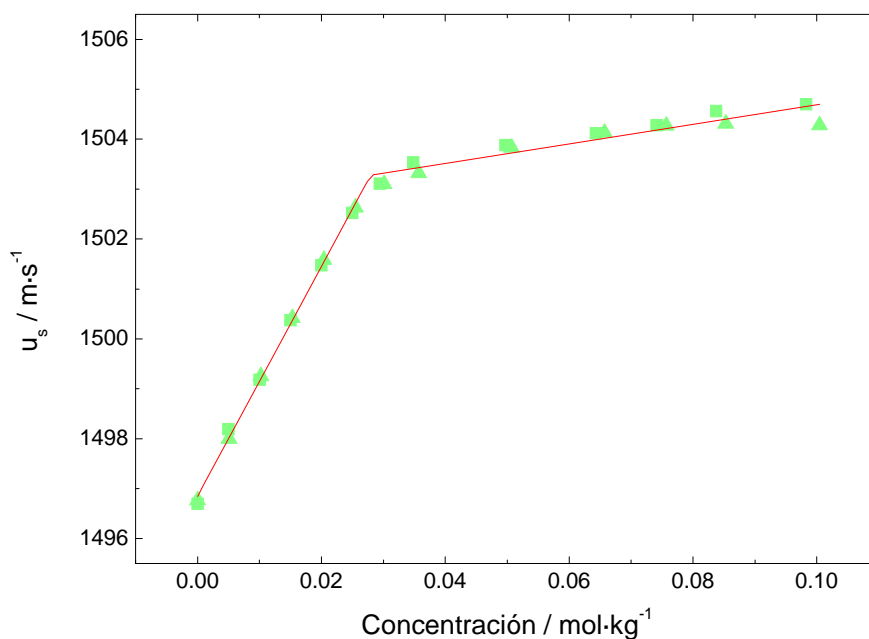
### 5.3 Resultados

En este apartado se muestran los resultados más relevantes obtenidos para el estudio del NaL. Éste se ha dividido en tres grandes subapartados: en el primero se valida la metodología con los datos a presión atmosférica y se discuten y evalúan las incertidumbres; en el segundo, se estudia el efecto de la temperatura; y en el tercero, se estudia el efecto de la presión desde presión atmosférica a 700 MPa a temperatura

constante (298.15 K). En los experimentos a alta presión se debe tener en cuenta la transición entre el agua de baja densidad y de alta densidad.

### 5.3.1 Determinación de la concentración micelar crítica a 298.15 K y presión atmosférica: validación de la metodología

En este primer bloque, se presentan los resultados de las medidas de velocidad del sonido en las disoluciones de NaL en función de la concentración a 298.15 K obtenidos a presión atmosférica. En la Figura 5.8, se representan los datos para los dos experimentos hechos. Como posibles fuentes aleatorias de incertidumbre experimental que expliquen las diferencias entre una serie y otra podemos citar la presencia fortuita de aire en la muestra durante la medida y la evaporación puntual del disolvente durante la toma de muestra del vaso a pesar de las precauciones tomadas (desgasificación y sellado de los vasos de precipitados con Parafilm®). Se puede apreciar que existe una mayor dispersión en las medidas realizadas en la serie 1. Se observa cómo la velocidad del sonido aumenta de forma progresiva con la concentración hasta llegar a una concentración en la que se produce un cambio de tendencia y continúa aumentando pero en menor medida. La concentración a la que se produce este cambio de tendencia en la velocidad del sonido es la CMC a 298.15 K y presión atmosférica.



**Figura 5.8.** Variación de la velocidad del sonido frente a la concentración para el NaL a 298.15 K y presión atmosférica. Los símbolos cuadrados (■) representan los experimentos de la serie 1 y los triángulos (▲) los de la serie 2. Las líneas representan el ajuste de las dos series de datos con la Ecuación 5.1. Los valores de los parámetros A, B, C y D pueden verse con sus respectivos errores en la Tabla 5.4.

En la primera región la velocidad del sonido aumenta desde unos  $1496.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta  $1503.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , esto es, aumenta aproximadamente un 0.5 %. En cambio, en la región postmicelar, hasta las concentraciones estudiadas, la velocidad del sonido aumenta sólo  $1.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , es decir, un 0.1 %.

Para optimizar la determinación de la CMC por el ajuste y comprobar si la inicialización de los parámetros influye o no en este ajuste (análisis de sensibilidad), se hicieron tres ajustes. Uno para cada una de las dos series de medidas por separado, y un tercero con todos los datos de las dos series. El valor inicial que se dio a cada uno de los parámetros fue un valor aproximado gráficamente y posteriormente dos valores más: el primero un 33 % mayor y el segundo un 33% menor. De tal forma que por ejemplo, para hacer el ajuste con el parámetro  $C = 13.33 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$ , el resto de parámetros eran siempre los de referencia, es decir,  $A = 0.03 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $B = 200 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$  y  $D = 1500 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Los valores de los parámetros que se utilizaron para iniciar el ajuste fueron los indicados en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Valores de los parámetros A, B, C y D iniciales para los ajustes de los datos de la Figura 5.9 utilizando la ecuación 5.1 para la determinación de la CMC. En negrita se indican los valores de referencia de los parámetros A, B, C y D.

A $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$			B $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$			C $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$			D $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$		
0.04	<b>0.03</b>	0.02	267	<b>200</b>	133	13.33	<b>10.00</b>	6.66	2000	<b>1500</b>	1300

En el caso del parámetro D, ordenada en el origen de la región postmicelar, se observó que no era posible dar un valor inferior al 33% ( $1000 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) puesto que el ajuste no convergía y se dio el valor de  $1300 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . En este sentido, se puede concluir que el ajuste es muy sensible al valor inicial propuesto para el parámetro D puesto que si no tienen sentido físico (el valor de la velocidad del sonido a concentración cero extrapolando la región postmicelar) el ajuste no converge.

Una vez establecidos los valores de A, B, C y D para que el ajuste converja como se muestra en la Tabla 5.1., se hicieron los ajustes mencionados, en total 36. En la Tabla 5.2, donde se recogen los valores de CMC obtenidos para todos los ajustes, se observaron diferencias menores para dichos valores.

Los valores de CMC para la serie 1 toman los valores de  $(0.0280 \pm 0.0007) \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  y  $(0.0298 \pm 0.0009) \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  dependiendo de los valores iniciales de

los parámetros de ajuste. La diferencia que existe entre los dos valores de CMC es de un 6.6 %. El valor de  $(0.0280 \pm 0.0007) \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$  guarda mayor concordancia con los determinados por otros autores mediante otras técnicas a 298.15 K y presión atmosférica (véase la comparación realizada más adelante en la Tabla 5.3).

**Tabla 5.2.** Tabla resumen con los valores de referencia de los parámetros de ajuste en negrita y la variación de  $\pm 33\%$ . Se obtienen diferentes valores de CMC para cada serie de experimentos y en función del valor inicial de los parámetros de ajuste.

Parámetro de ajuste	Valor inicial	CMC / $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$		
		Serie 1	Serie 2	Serie 1 + 2
A / $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.04	0.0298	0.0279	0.0279
	<b>0.03</b>	0.0298	0.0279	0.0279
	0.02	0.0280	0.0279	0.0279
B / $\text{m} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{kg}$	267	0.0298	0.0279	0.0279
	<b>200</b>	0.0298	0.0279	0.0279
	133	0.0298	0.0279	0.0279
C / $\text{m} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{kg}$	13.33	0.0298	0.0279	0.0279
	<b>10.00</b>	0.0298	0.0279	0.0279
	6.66	0.0298	0.0279	0.0279
D / $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$	2000	0.0280	0.0279	0.0279
	<b>1500</b>	0.0298	0.0279	0.0279
	1300	0.0280	0.0279	0.0279

Los valores de CMC para la serie 2 toman el valor de  $(0.0279 \pm 0.0008) \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$  para todos los casos, independientemente de los valores iniciales de los parámetros de ajuste. Los valores de velocidad del sonido a 298.15 K y presión atmosférica para la serie 2 presentan menos dispersión, luego el hecho de variar los parámetros de ajuste A, B, C y D un 33 % no afecta al valor de CMC obtenido. Además, este valor de CMC para la serie 2 es muy similar a los propuestos en la bibliografía (véase la Tabla 5.3).

Cuando se hace un ajuste global con todos los datos de velocidad del sonido medidos, es decir, las series 1 y 2 conjuntamente, no se observa diferencia en el valor de CMC obtenido en función de los parámetros iniciales de ajuste. El valor de CMC obtenido en este caso es  $(0.0279 \pm 0.0005) \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ , que nuevamente está dentro del intervalo de valores determinados en la literatura, como se puede apreciar en la Tabla 5.3 donde se han resumido los valores de la CMC a 298.15 K obtenidos mediante diferentes técnicas.

**Tabla 5.3.** Tabla resumen con los valores de CMC obtenidos a 298.15 K a partir de las medidas de velocidad del sonido de esta tesis y los recogidos en la literatura determinados mediante diferentes técnicas.

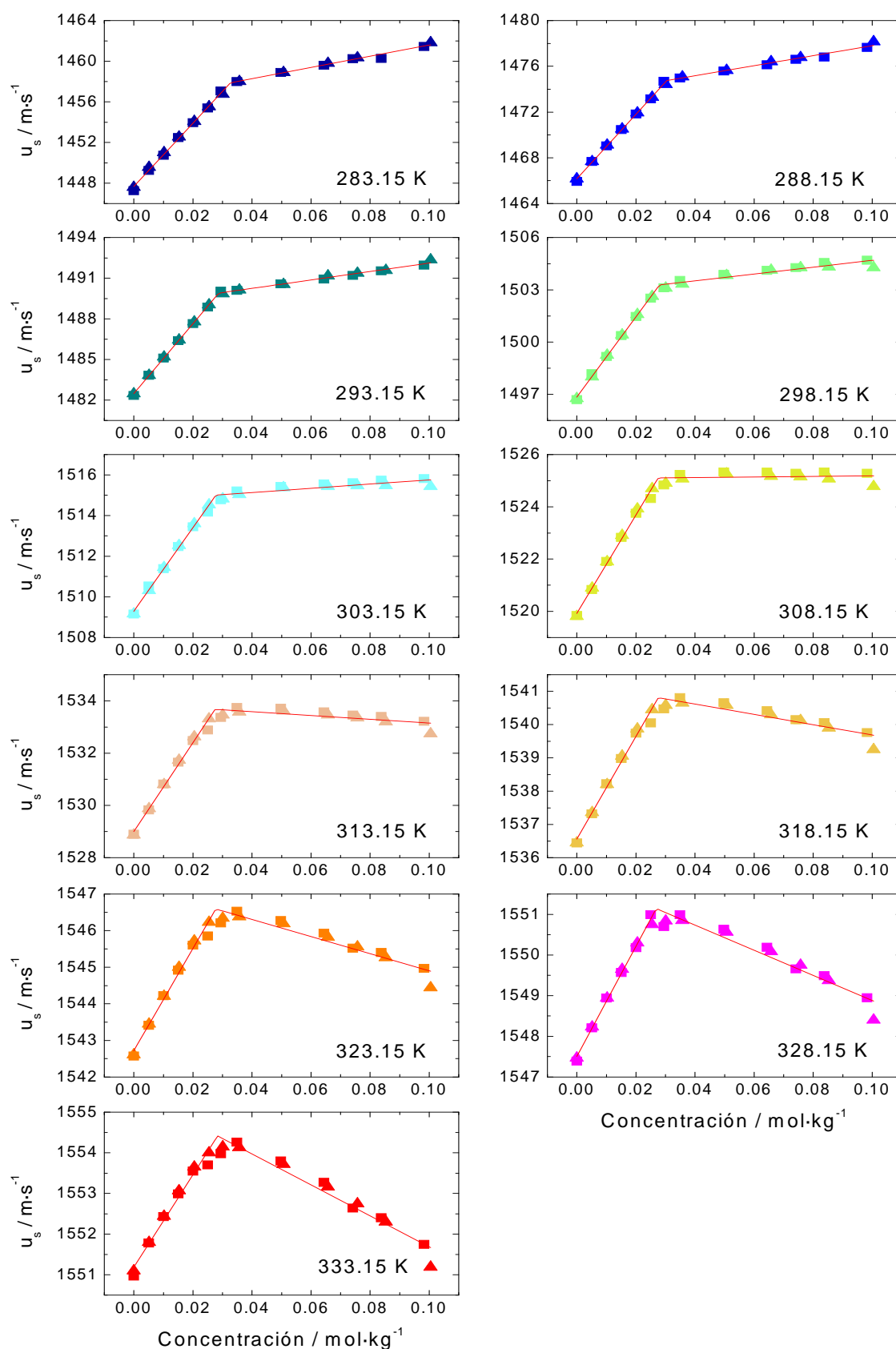
CMC / mol·kg <sup>-1</sup>	Técnica experimental	Referencia
0.0279 ± 0.0005	Velocidad del sonido	Este trabajo
0.0286	Densidad y velocidad del sonido	Blanco y col. <sup>14</sup>
0.0280	Densidad y velocidad del sonido	Huang y Verrall <sup>15</sup>
0.0281	Densidad	Lisi y col. <sup>16</sup> 16
0.0246	Conductancia	NSRDS <sup>5</sup>
0.0278	Conductancia	Brun y col. <sup>12</sup>
0.0279	Conductancia	NSRDS <sup>5</sup>
0.0232	Tensión superficial	NSRDS <sup>5</sup>

A la vista de los valores de CMC recogidos en la bibliografía, podemos observar cómo cuando la técnica utilizada ha sido densidad y velocidad del sonido, los valores son muy similares al obtenido en este trabajo, así como para dos de las referencias en las que se usa la técnica de conductancia. La mayor diferencia se da en el caso de la técnica de medida de la tensión superficial, que parece más sensible al inicio de la micelización que las demás técnicas, dando un valor 0.0050 mol·kg<sup>-1</sup> inferior a los demás.

### 5.3.2 Estudio del efecto de la temperatura sobre la formación de micelas a presión atmosférica

Se han hecho medidas de la velocidad del sonido y densidad a presión atmosférica y en un intervalo de temperatura de 283.15 hasta 333.15 K, utilizando el equipo Anton Paar DSA 5000M. En concreto, se hicieron también dos series de experimentos en el intervalo de concentración desde 0.0050 hasta 0.1000 mol·kg<sup>-1</sup>. Los valores de estas medidas quedan recogidos en el Apéndice 2. En este capítulo se discutirán los resultados de velocidad del sonido y en el Capítulo 7 los datos de densidad se utilizarán para obtener propiedades aparentes de las disoluciones acuosas de NaL.

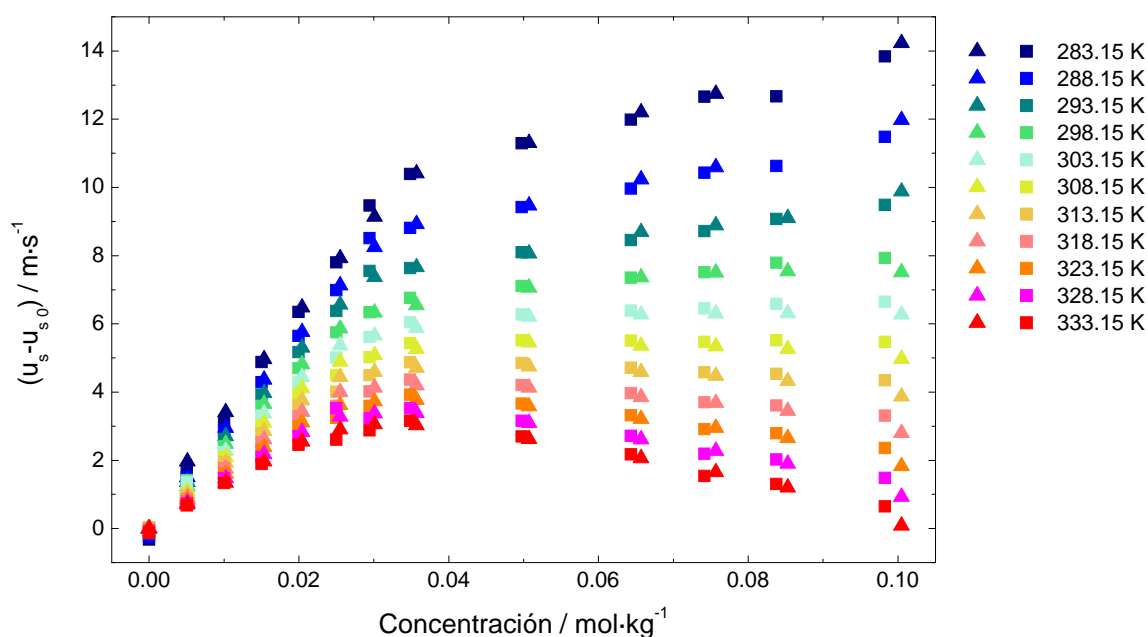
En la Figura 5.9 se ha representado la variación de la velocidad del sonido con la concentración para todas las isothermas estudiadas. Se puede observar que a medida que aumenta la temperatura, la velocidad del sonido es mayor para una misma concentración. Por otro lado, se observa que en la región premicelar la variación de la velocidad del sonido con la concentración tiene una pendiente positiva para todas las isothermas estudiadas, cuya magnitud se verá más adelante. En cambio, en la región postmicelar el signo de la pendiente varía con la temperatura. A 283.15 K la pendiente es de unos  $60 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$  y llega a ser de  $-40 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$  para la temperatura más alta estudiada 333.15 K. El cambio de signo de la pendiente se produce a una temperatura entre 308.15 y 313.15 K.



**Figura 5.9.** Variación de la velocidad del sonido con la concentración para cada una de las temperaturas estudiadas para las dos series de experimentos. Los símbolos cuadrados (■) representan los experimentos de la serie 1 y los triángulos (▲) los de la serie 2. Las líneas rojas representan los valores calculados con el ajuste con el conjunto de las dos series de datos a la Ecuación 5.1. Los parámetros obtenidos se resumen en la Tabla 5.4.



En la Figura 5.10 se ha representado la diferencia entre la velocidad del sonido en la disolución y el disolvente puro frente a la concentración para las dos series de medidas realizadas. Como se puede observar, la variación de la velocidad del sonido, con respecto a la del agua, en el intervalo de concentraciones estudiado hasta  $0.1000 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  es de aproximadamente  $14 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  a  $283.15 \text{ K}$ , y de apenas  $3.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  para las temperaturas más altas estudiadas de  $328.15$  y  $333.15 \text{ K}$ .



**Figura 5.10.** Diferencia entre las velocidades del sonido de la disolución y el disolvente puro ( $u_{s0}$ ) en función de la concentración para todas las isotermas estudiadas. Los símbolos cuadrados (■) representan los experimentos de la serie 1 y los triángulos (▲) los de la serie 2.

A partir de las medidas de la velocidad del sonido se ha determinado la variación de la CMC del NaL en función de la temperatura. Para ello, se ha utilizado la metodología validada anteriormente en el caso de  $298.15 \text{ K}$ : se han ajustado los datos a la Ecuación 5.1 utilizando las dos series de datos provenientes de experimentos independientes. Esta metodología se ha aplicado a cada temperatura por separado. En la Tabla 5.4 se recogen los parámetros obtenidos y en la Figura 5.9 se han representado dichos ajustes.

La pendiente en la región premicelar es positiva a cualquier temperatura, disminuyendo al aumentar la temperatura desde  $312 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$  a  $283.15 \text{ K}$ , hasta  $114 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$ , es decir, un 63 %. En cuanto a la pendiente en la región postmicelar ésta también disminuye, desde  $55 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$  hasta  $-38 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$ . En cuanto al parámetro  $D$  aumenta al aumentar la temperatura desde  $1456 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta  $1555 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , un 7 % en  $323.15 \text{ K}$ . Por último, en lo que se refiere a la CMC se puede observar en

nuestros resultados que la CMC del NaL disminuye con la temperatura hasta llegar a un valor mínimo de  $0.0275 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  en torno a  $308.15 - 313.15 \text{ K}$ .

**Tabla 5.4.** Parámetros de ajuste de la Ecuación 5.1 a los datos representados en la Figura 5.10 y valor de  $R^2$ . Para evitar errores de redondeo se han dejado algunas cifras no significativas en los parámetros.

Temperatura K	$10^2 \cdot \text{CMC}$ $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	B $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$	C $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{kg}$	D $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$R^2$
283.15	$3.27 \pm 0.06$	$312.2 \pm 5.0$	$55.0 \pm 2.6$	$1456.09 \pm 0.18$	0.9983
288.15	$3.05 \pm 0.05$	$282.0 \pm 3.8$	$43.7 \pm 2.0$	$1473.43 \pm 0.13$	0.9986
293.15	$2.87 \pm 0.03$	$258.1 \pm 2.9$	$31.1 \pm 1.0$	$1489.00 \pm 0.07$	0.9992
298.15	$2.79 \pm 0.05$	$230.2 \pm 5.1$	$19.6 \pm 1.7$	$1502.72 \pm 0.11$	0.9965
303.15	$2.77 \pm 0.06$	$205.9 \pm 5.3$	$10.5 \pm 1.8$	$1514.70 \pm 0.12$	0.9946
308.15	$2.75 \pm 0.07$	$188.3 \pm 5.7$	$1.2 \pm 1.9$	$1525.07 \pm 0.13$	0.9916
313.15	$2.75 \pm 0.07$	$170.1 \pm 5.8$	$-7.2 \pm 2.0$	$1533.87 \pm 0.13$	0.9875
318.15	$2.76 \pm 0.08$	$154.2 \pm 5.9$	$-15.5 \pm 2.0$	$1541.23 \pm 0.13$	0.9820
323.15	$2.77 \pm 0.08$	$139.8 \pm 6.1$	$-23.4 \pm 2.1$	$1547.23 \pm 0.13$	0.9748
328.15	$2.78 \pm 0.08$	$135.4 \pm 1.9$	$-30.9 \pm 1.9$	$1551.97 \pm 0.12$	0.9749
333.15	$2.84 \pm 0.09$	$113.8 \pm 6.6$	$-38.1 \pm 2.2$	$1555.49 \pm 0.14$	0.9619

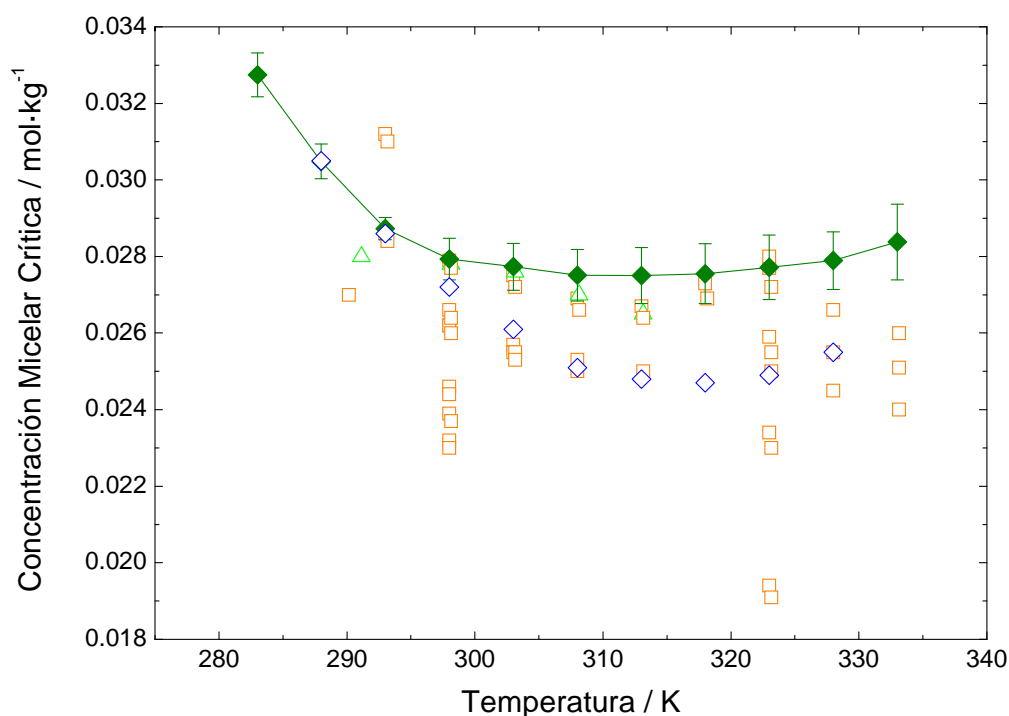
En la Tabla 5.5 se ha comparado el resultado obtenido para los valores de CMC en función de la temperatura para los experimentos realizados en esta tesis y los valores estimados con otras técnicas experimentales que aparecen en la bibliografía. Como se puede apreciar el valor obtenido para la CMC tiene un buen acuerdo con los datos bibliográficos. Podemos afirmar, por tanto, que la técnica y la metodología usadas son válidas para determinar el valor de la CMC para el NaL a presión atmosférica y en función de la temperatura.

**Tabla 5.5.** Concentración micelar crítica para las disoluciones acuosas de dodecanoato de sodio obtenida mediante diferentes técnicas experimentales y para diferentes temperaturas.

$10^2 \cdot \text{CMC}$ $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	Técnica experimental	Referencia
<b>T = 283.15 K</b>		
3.27	Velocidad del sonido	Este trabajo
<b>T = 288.15 K</b>		
3.05	Velocidad del sonido	Este trabajo
<b>T = 293.15 K</b>		
3.12	Viscosimetría	NSRDS <sup>5</sup>
2.86	Conductancia	NSRDS <sup>5</sup>
2.87	Velocidad del sonido	Este trabajo
<b>T = 303.15 K</b>		
2.75	Conductancia	NSRDS <sup>5</sup>
2.57	Solubilización PDMA	NSRDS <sup>5</sup>
2.55	Solubilización OROT	NSRDS <sup>5</sup>
2.77	Velocidad del sonido	Este trabajo
<b>T = 308.15 K</b>		
2.69	Conductancia	NSRDS <sup>5</sup>
2.53	Conductancia Equivalente	NSRDS <sup>5</sup>
2.75	Velocidad del sonido	Este trabajo
<b>T = 313.15 K</b>		
2.67	Conductancia	NSRDS <sup>5</sup>
2.53	Fotometría solubilización	NSRDS <sup>5</sup>
2.75	Velocidad del sonido	Este trabajo
<b>T = 318.15 K</b>		
2.73	Conductancia	NSRDS
2.76	Velocidad del sonido	Este trabajo
<b>T = 323.15 K</b>		
2.77	Fotometría solubilización	NSRDS <sup>5</sup>
2.59	Fotometría solubilización	NSRDS <sup>5</sup>
2.85	Tensión superficial	NSRDS <sup>5</sup>
1.94	Espectroscopía	NSRDS <sup>5</sup>
2.19	Conductancia	NSRDS <sup>5</sup>
2.77	Velocidad del sonido	Este trabajo
<b>T = 328.15 K</b>		
2.78	Velocidad del sonido	Este trabajo
<b>T = 333.15 K</b>		
2.66	pH hidrólisis	NSRDS <sup>5</sup>
2.66	Solubilización	NSRDS <sup>5</sup>
2.45	Fotometría	NSRDS <sup>5</sup>
2.84	Velocidad del sonido	Este trabajo

Para una misma temperatura, cuando hay varias referencias recogidas en la tabla, se puede observar cómo los valores más similares con los resultados de esta tesis, obtenidos mediante velocidad del sonido, corresponden con medidas de conductancia y con otras medidas de velocidad del sonido.

En la Figura 5.11 se ha representado la variación de la CMC con la temperatura obtenida en este trabajo y por los diferentes autores, mediante las distintas técnicas experimentales empleadas.



**Figura 5.11.** Variación de la concentración micelar crítica con la temperatura. (◆) Este trabajo, (◇) Blanco y col.<sup>14</sup>, (△) Brun y col.<sup>9</sup>, (□) NSRDS.<sup>5</sup>

Este comportamiento ya se ha descrito en la bibliografía. Así se conoce que una de las cualidades más sorprendentes del proceso de agregación micelar es la escasa dependencia de la concentración micelar crítica con la temperatura. En la mayoría de los tensioactivos iónicos se encuentra que la variación de la CMC con la temperatura presenta un mínimo. En el caso de los tensioactivos no iónicos o zwitteriónicos no puede realizarse esa afirmación, aunque algunos no iónicos presentan un mínimo de la CMC en torno a 323.15 K.<sup>17</sup> La aparición de un mínimo en la CMC con la temperatura puede explicarse teniendo en cuenta que, cuando la temperatura del sistema aumenta, el grado de hidratación de la cabeza hidrofílica disminuye favoreciendo así la autoasociación a concentraciones cada vez más bajas. Sin embargo, el mismo efecto que impide la hidratación de la cadena hidrofóbica, también reduce la interacción de las moléculas aisladas de agua, lo que produce un aumento de la solubilidad de la

parte hidrofóbica, dificultando, por tanto, el proceso de formación de las micelas. Puesto que el efecto de la temperatura provoca efectos contrapuestos, el resultado neto del aumento o disminución de la CMC dependerá de la magnitud relativa de ambos efectos.

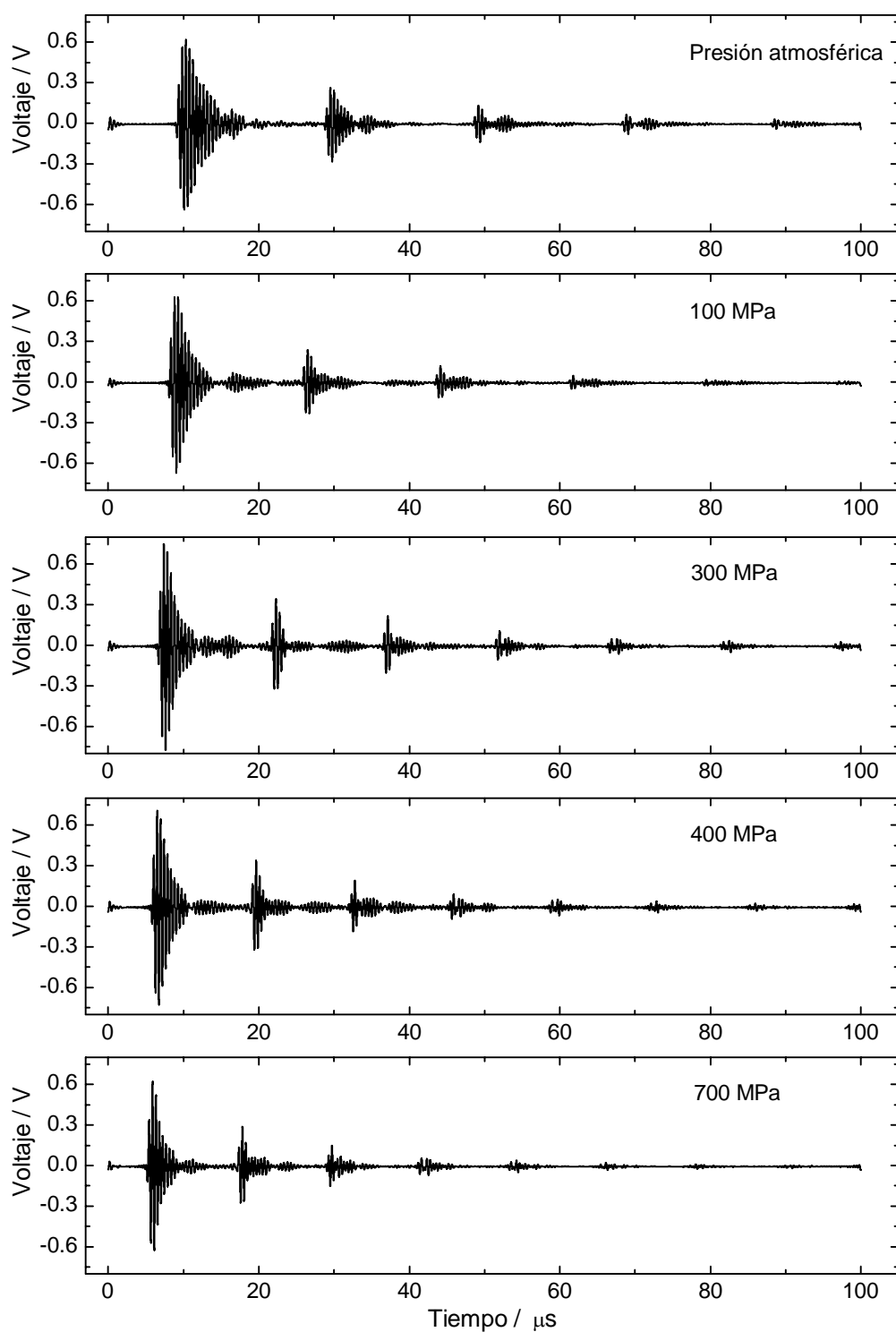
Una vez que hemos visto que la metodología usada para la preparación de las disoluciones y los datos de velocidad del sonido nos dan resultados consistentes vamos a pasar a analizar las medidas bajo presión.

### 5.3.3 Estudio del efecto de la presión a 298.15 K sobre la CMC

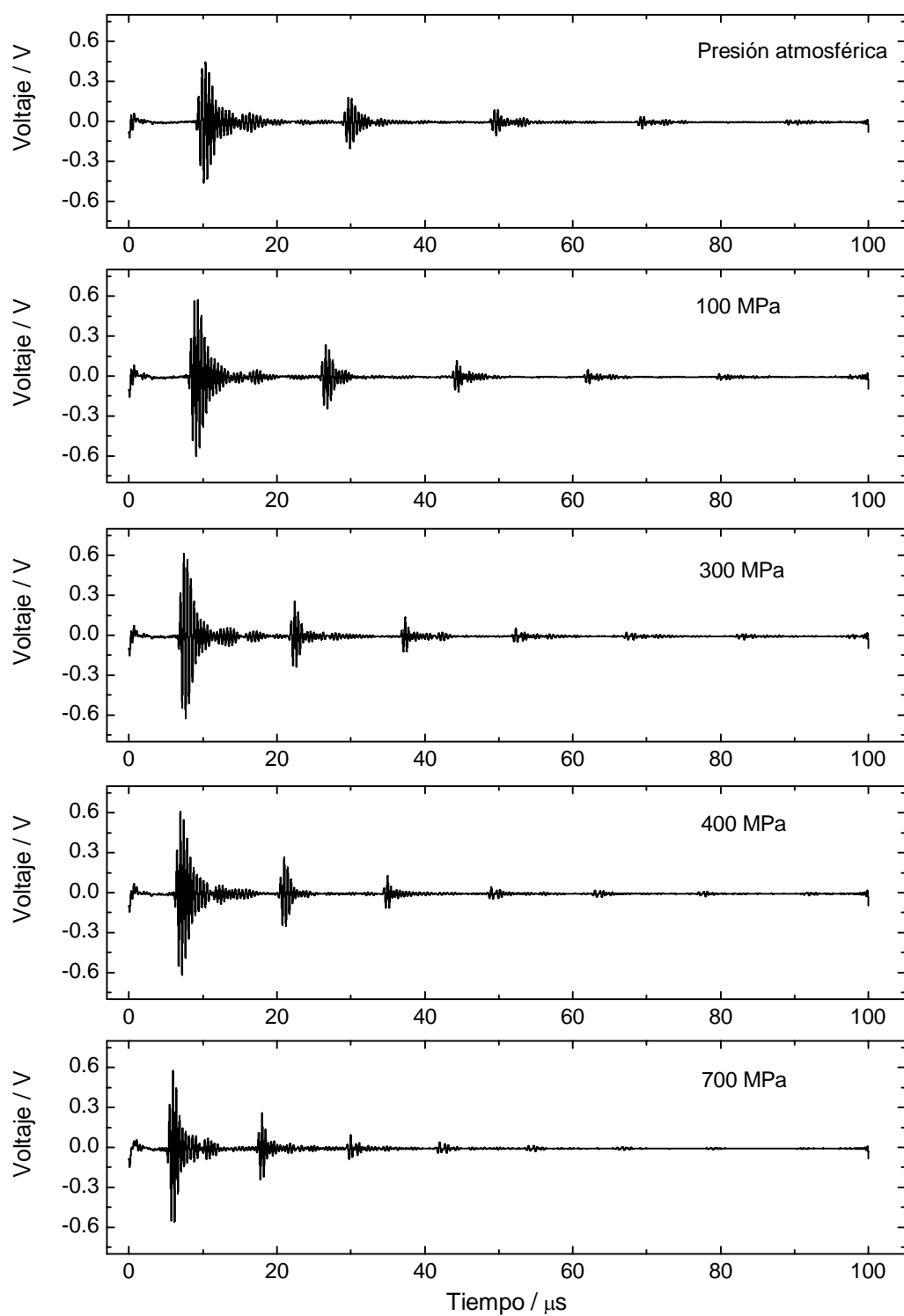
La determinación de la concentración micelar crítica en función de la presión para el dodecanoato de sodio se llevó a cabo mediante medidas de velocidad del sonido con la técnica de transmisión de ultrasonidos. En primer lugar se hizo una serie de experimentos en los que se comprobó la repetitividad de la velocidad del sonido en función de la presión para una misma preparación de disoluciones. En estos experimentos se observó que la repetitividad en la presión tenía una desviación estándar máxima de 1.7 MPa y la velocidad del sonido de  $2.4 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Estas desviaciones se producían siempre a las presiones más elevadas, donde es más difícil tener las mismas condiciones de presión. Para ello se eligieron tres concentraciones representativas: 0.0050, 0.0295 y  $0.1250 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Se hicieron dos series de experimentos, en las que, en ambos casos, se partió de una disolución madre  $0.1000 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , y a partir de ella se prepararon el resto de disoluciones por pesada. Las presiones elegidas fueron de 0.1 a 400 MPa con un intervalo de 50 MPa, y de 400 a 700 MPa se aumentó la presión cada 100 MPa.

En las Figuras 5.12 y 5.13 se muestran las medidas una vez tratadas mediante la metodología descrita en el Capítulo 3 (transformada de Fourier, posterior aplicación de un filtro y finalmente una transformada de Fourier inversa) para el agua y una de las disoluciones, respectivamente. En las figuras es posible apreciar cómo el hecho de aumentar la presión afecta claramente al tiempo de vuelo. Se puede ver cómo los distintos ecos se desplazan hacia tiempos menores y, por tanto, se acercan entre ellos.

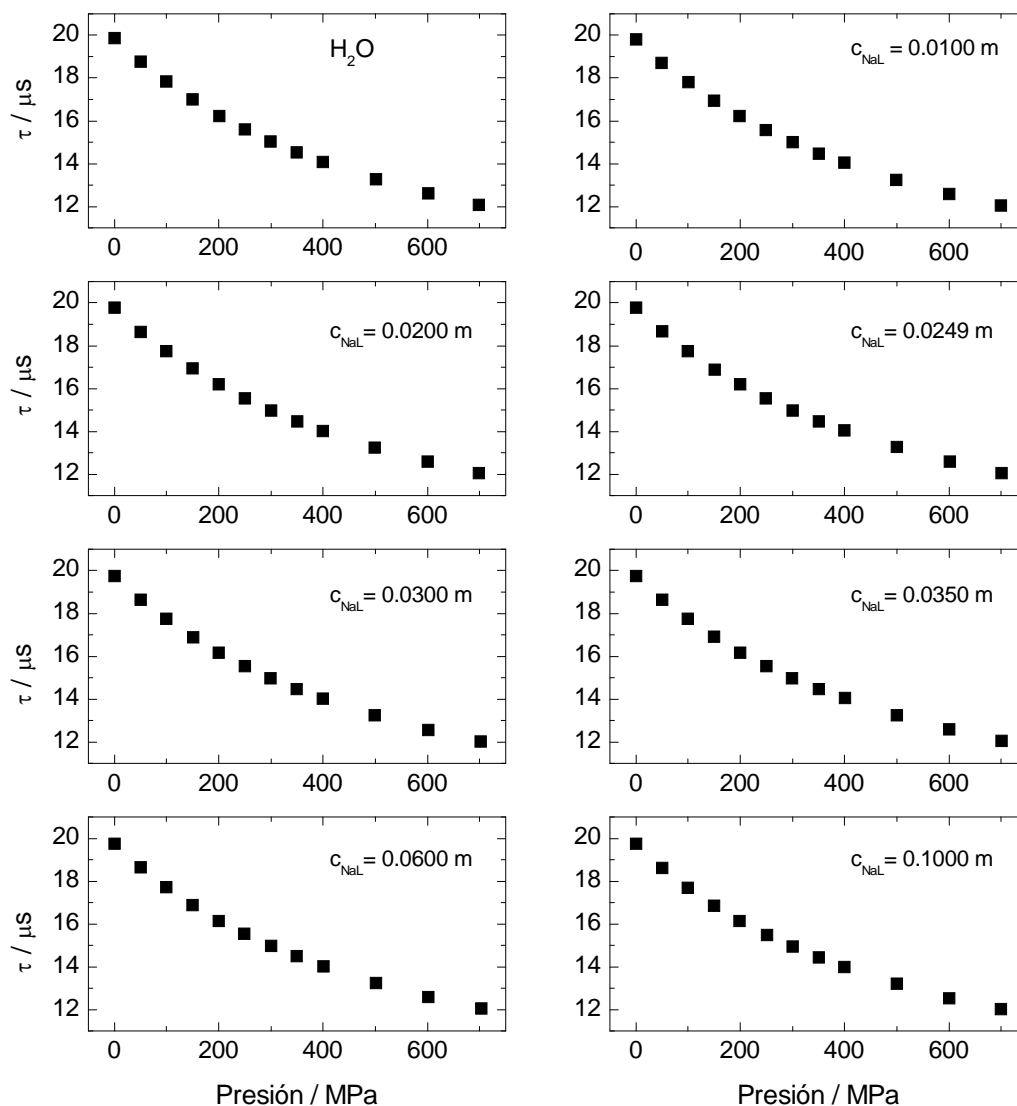
Para cada disolución y a cada presión se ha determinado el tiempo de vuelo,  $\tau$ , entre el piezoeléctrico emisor  $E$  y el piezoeléctrico receptor  $R$ . En la Figura 5.15 se muestra la variación de esta magnitud con la presión para varias disoluciones. Para todos ellos se observa como el tiempo de vuelo disminuye al aumentar la presión.



**Figura 5.12.** Señal de la onda ultrasónica en agua una vez a diferentes presiones.



**Figura 5.13.** Señal de la onda ultrasónica para una disolución acuosa de concentración 0.0249 mol·kg<sup>-1</sup> de NaL a diferentes presiones.



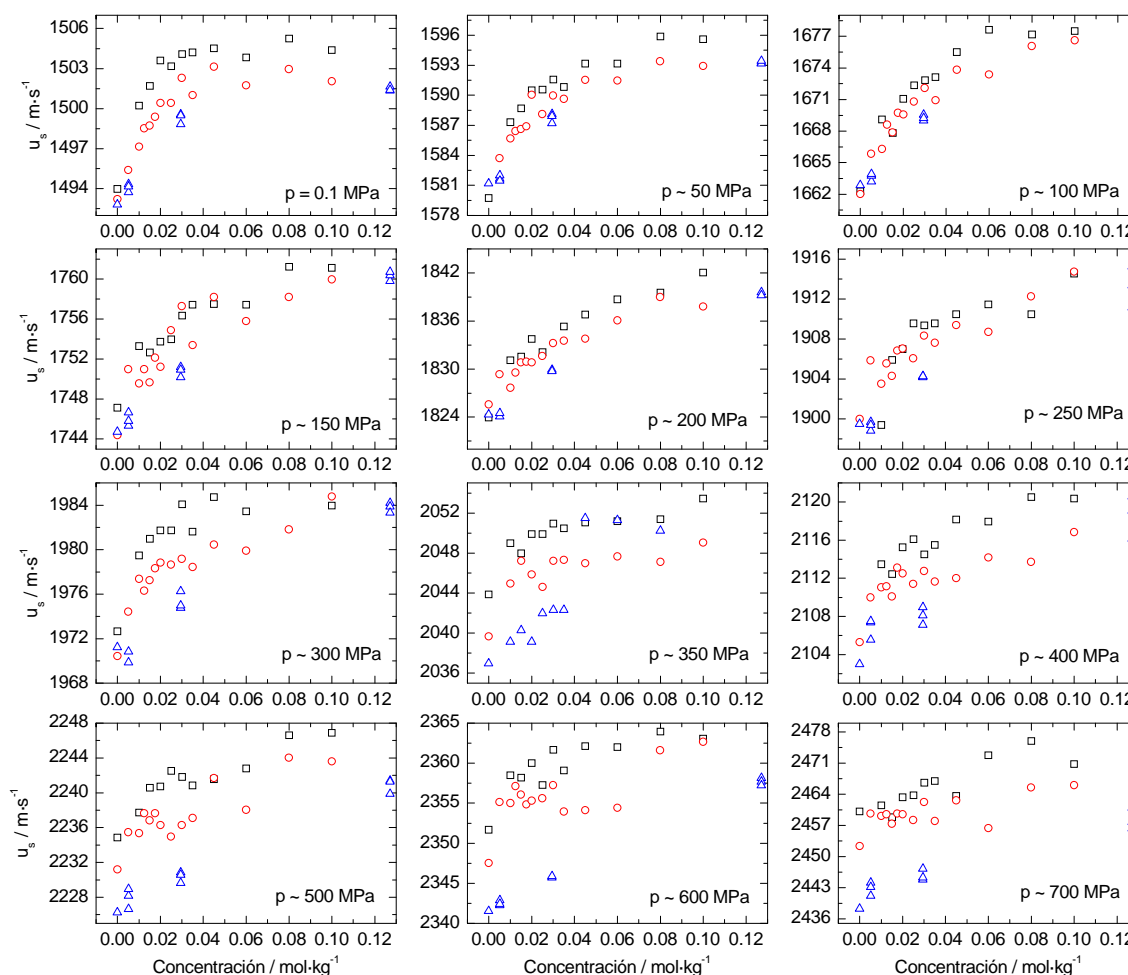
**Figura 5.14.** Evolución del tiempo de vuelo,  $\tau$ , con la presión para algunas de las disoluciones de NaL de una de las series de experimentos.  $m = \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$

Con estos resultados es posible apreciar que, a una determinada presión, las diferencias entre los valores de  $\tau$  para el agua y el resto de las disoluciones son muy pequeñas y que, por tanto, a cada presión, la variación de la velocidad del sonido con la concentración también es muy pequeña, por lo que la estimación de la CMC para cada isobara al ir aumentando la presión es cada vez más compleja. A ello se une que la dispersión de los datos es mayor, dada la mayor incertidumbre en las medidas a altas presiones. Por ejemplo, para la disolución de  $0.0295 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ , los valores de presión tuvieron una desviación estándar máxima de  $0.4 \text{ MPa}$  lo que se tradujo en una desviación estándar para la velocidad del sonido de  $1.3 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Las evidencias que demuestran la existencia de fases micelares a alta presión se basan en el cambio de pendiente que se observa a partir de la CMC. Si la tendencia que sigue la velocidad del sonido cambia a partir de cierta concentración (CMC) quiere decir que el medio en el



que se transmite la onda ultrasónica es diferente. Esta es una de las evidencias que demuestran la existencia de agregados a alta presión.

En la Figura 5.15 se muestran los resultados de velocidad del sonido en función de la concentración para todas las compresiones realizadas en las distintas series de experimentos.



**Figura 5.15.** Variación de la velocidad del sonido con la concentración para las diferentes presiones a las que se sometió una de las series de las disoluciones acuosas de NaL a 298.15 K. Se debe tener en cuenta que la dispersión en los valores de velocidad del sonido para una misma concentración se debe a que las medidas no son exactamente isobáricas. ( $\Delta$ ) Serie 1, ( $\square$ ) Serie 2, ( $\circ$ ) Serie 3.

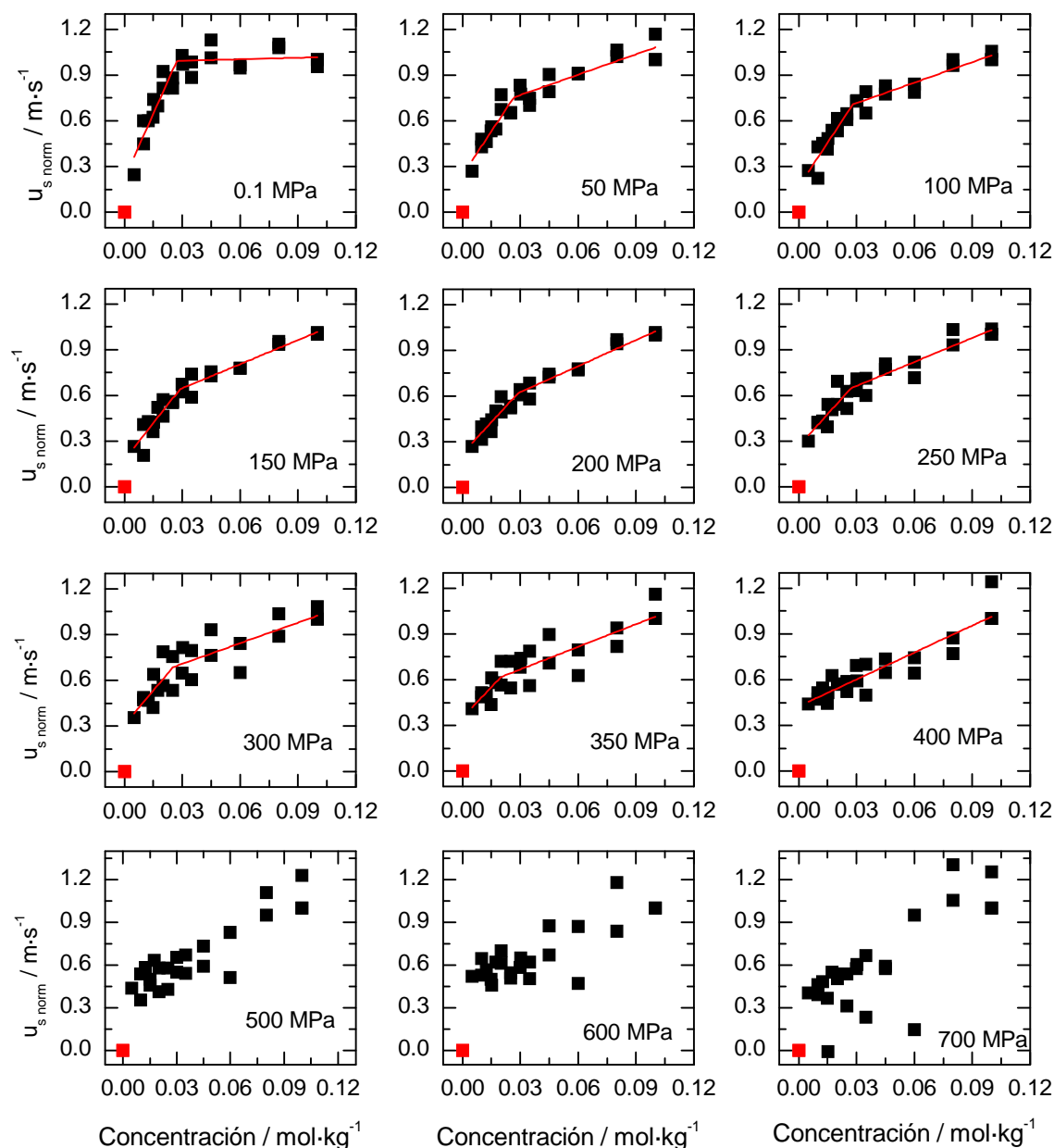
Como se aprecia en la Figura 5.15, existe dispersión en los valores de velocidad del sonido para una misma concentración entre las tres series de experimentos. Este hecho se debe a la imposibilidad de realizar las medidas de forma isobárica. Esto implica que en algunos casos, la desviación entre los valores de velocidad del sonido fuera mayor que la incertidumbre esperada con la que poder determinar posteriormente la CMC. Por ello, se corrigieron los valores utilizando un polinomio de grado 8 para obtener los valores de velocidad del sonido a la misma presión.

El efecto de la presión en la velocidad del sonido de las disoluciones es analizado mejor si se normalizan estos resultados con los valores de la velocidad del sonido del agua a cada presión. De modo que utilizando la Ecuación 5.2 se puede obtener una velocidad del sonido normalizada,  $u_{s\,norm}$ , que calculamos como el cociente de las diferencias de las velocidades del sonido de una concentración a una presión y temperatura dadas ( $u_s(c,p,T)$ ) y la velocidad del sonido del agua a dicha presión y temperatura ( $u_{s0}(p,T)$ ), entre la diferencias de las velocidades del sonido para la máxima concentración de la disolución y el agua.

$$u_{s\,norm} = \frac{u_s(c,p,T) - u_{s0}(p,T)}{u_s(c_{m\acute{a}x},p,T) - u_{s0}(p,T)} \quad \text{Ecuación 5.2}$$

En la Figura 5.16 se han representado estos resultados para las dos series de experimentos, apreciando ahora bien las pequeñas variaciones que se comentaban anteriormente.

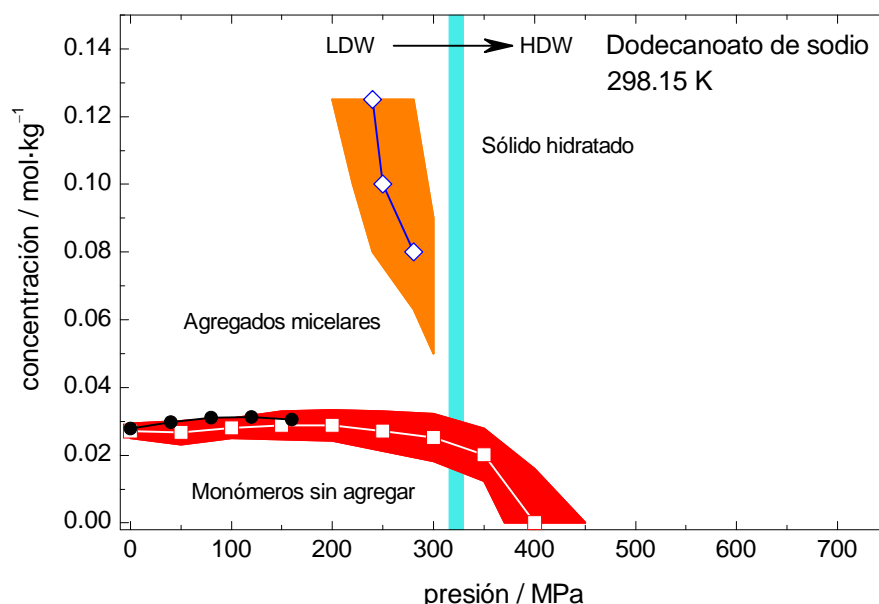
Al igual que en el caso en el que se ha determinado la concentración micelar crítica a presión atmosférica para las diferentes temperaturas, se aprecia un cambio de pendiente correspondiente al paso de la zona premicelar a la postmicelar. Estos cambios han sido señalados en dichas figuras con los ajustes lineales marcados en rojo que indican la CMC para cada presión y ha podido distinguirse hasta presiones del orden de 350 MPa. A presiones superiores, no se aprecia un cambio de pendiente sino más bien un crecimiento continuo en los valores de velocidad del sonido normalizada, lo que indica que no hay CMC. El punto a concentración cero se ha marcado en rojo y no ha sido tenido en cuenta a la hora de hacer los ajustes para determinar la CMC.



**Figura 5.16.** Variación con la concentración de la velocidad del sonido normalizada con la presión para el NaA a 298.15 K. El punto rojo no se ha tenido en cuenta para realizar los ajustes.

En la Figura 5.17 se muestra la variación de la CMC con la presión obtenida con estos resultados. Se aprecia cómo la CMC aumenta hasta presiones de unos 170 MPa, y está en buen acuerdo con los resultados recogidos en la bibliografía.<sup>9</sup> A presiones superiores, del orden de 300 – 350 MPa, la CMC disminuye de forma brusca, lo que quiere decir que a concentraciones bajas se ha superado la presión de Tanaka.<sup>18</sup> A partir de este punto ya no se produce el fenómeno de micelización. De acuerdo con lo que se ha observado en otros surfactantes (perfluorodecanoato de sodio o dodecil sulfato sódico)<sup>19</sup> al sobrepasar la presión de Tanaka pasamos a un régimen diferente en el que parece que no hay agregados micelares clásicos como en la anterior fase.

Esta nueva fase se ha definido en la bibliografía como agregados sólidos hidratados. Éstos pueden precipitar al ser sólidos y producir un cambio en la señal que recogen los piezoelectrónicos. Este hecho se demuestra posteriormente con el análisis de la atenuación de la señal y se ha representado en el diagrama fases en la Figura 5.17 con una línea de color naranja.



**Figura 5.17.** Estimación del diagrama de fases del sistema agua-NaL a una temperatura de 298.15 K. Los símbolos (□) representan la estimación de la CMC de acuerdo con nuestros resultados de velocidad del sonido. Los símbolos (◇) representan la estimación de la concentración donde se produce el cambio de fase de agregados micelares a sólido hidratado y los símbolos (●) representan la variación con la presión de la CMC obtenida en la Ref. [9]. La franja azul representa la presión de transición entre el agua de baja densidad (LDW) y el agua de alta densidad (HDW) a 298.15 K de acuerdo con los resultados obtenidos en el Capítulo 4.

A presiones superiores a 400 MPa no se ha trabajado con disoluciones lo suficientemente diluidas para que seamos capaces de distinguir el cambio de comportamiento entre la región premicelar a la postmicelar.

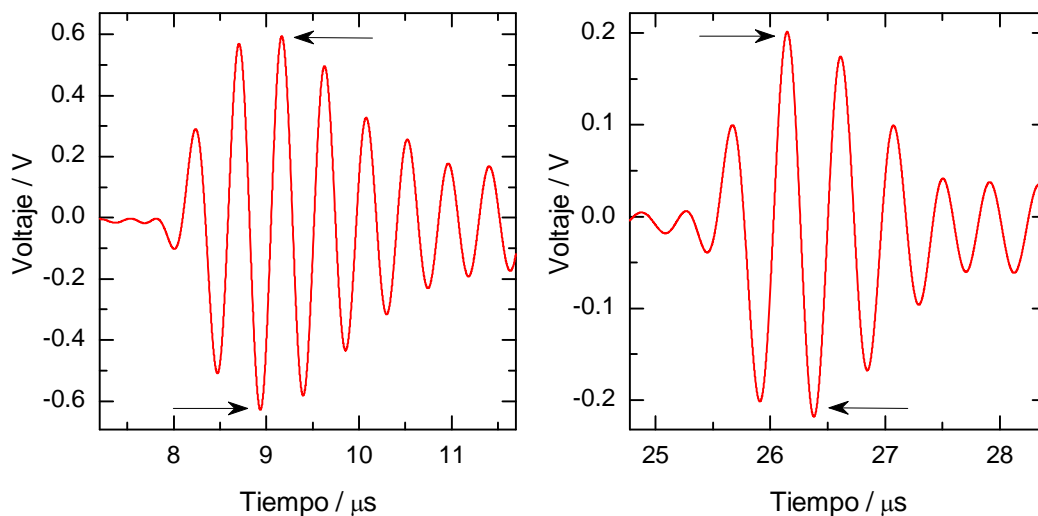
El hecho de que se observe una transición entre agregados micelares y el sólido hidratado puede deberse al hecho de que en el mismo intervalo de presión se esté produciendo el cambio entre el LDW y el HDW. A elevadas presiones, los agregados micelares comienzan a solidificar, hecho que se demuestra a continuación con la atenuación de la señal. Los agregados sólidos son capaces de modificar la señal y la velocidad del sonido, puesto que, como ya se ha visto a lo largo de la tesis, la velocidad del sonido es muy sensible al medio por el que se transmite. Por ello, se observa un cambio en la velocidad del sonido y la atenuación de la señal. Estos nuevos agregados sólidos, se recubren de moléculas de agua de solvatación y al estar produciéndose la

transición entre el LDW y el HDW no es posible determinar con claridad las condiciones de presión – concentración a las que se producen, puesto que son varios fenómenos de agregación diferentes los que están teniendo lugar: el paso de agregados micelares a sólido hidratado en el NaL, y la propia reorganización del medio en el que se encuentra, es decir, la transición LDW  $\rightarrow$  HDW.

Como ya se ha comentado, también es posible utilizar la denominada atenuación de la señal,  $At$  para demostrar la existencia de una diferente fase a altas presiones y altas concentraciones de NaL. La atenuación de la señal se puede asimilar al debilitamiento en amplitud de la onda ultrasónica debido a que ésta se va alejando del foco emisor. Aunque la amplitud de la onda va decreciendo, su longitud de onda y frecuencia permanecen invariable, ya que éstas dependen únicamente del foco emisor. En nuestro caso, la disminución de la amplitud se debe a la absorción de la vibración, que es un proceso disipativo por el cual parte de la potencia de la onda es absorbida por un material aislante. En el caso de las disoluciones de dodecanotato de sodio, la onda no es disipada por un material aislante, sino que la onda se transmite de forma diferente por unas fases u otras. Esta magnitud se puede obtener a partir de las medidas realizadas mediante la siguiente ecuación:

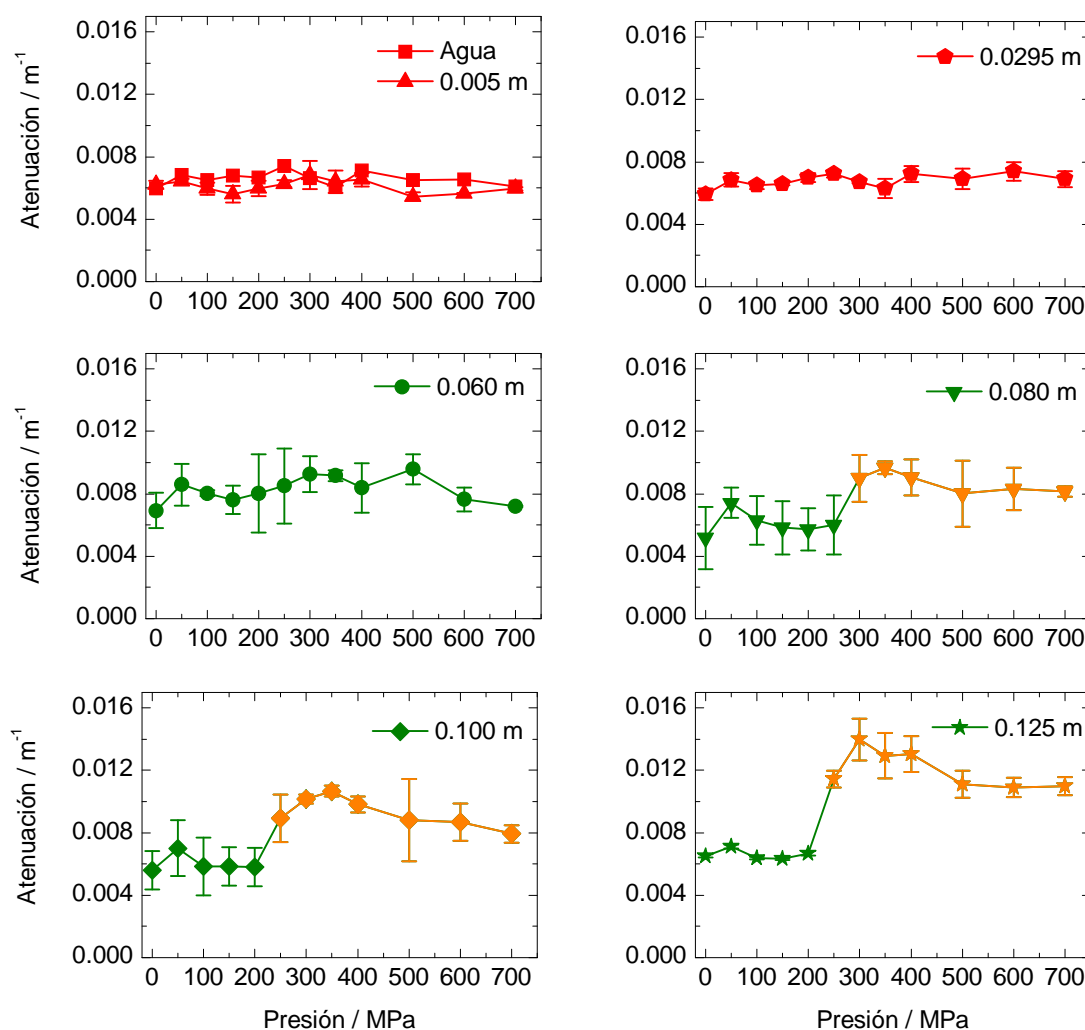
$$At = \frac{1}{2d} \ln \frac{A_1}{A_2} \quad \text{Ecuación 5.3}$$

donde  $d$  es la distancia entre los piezoelectricos y  $A_1$  y  $A_2$  son las amplitudes del primer y segundo eco, respectivamente, es decir, la diferencia que existe entre el voltaje del máximo y el mínimo absolutos del primer y segundo eco. Un ejemplo de lo que representa la amplitud se muestra en la Figura 5.19. Las flechas indican el máximo y el mínimo absolutos de cada uno de los ecos.



**Figura 5.18.** Representación de la amplitud para el primer y segundo eco, respectivamente.

En la Figura 5.19 se representa la variación de la atenuación de la señal con la presión para varias disoluciones. En ella se ha hecho un promedio de varias medidas para cada disolución, representando la desviación para cada concentración mediante barras de error. La atenuación de las concentraciones más diluidas se mantiene constante a lo largo de todo el intervalo de presión, luego quiere decir que la onda ultrasónica se está transmitiendo por el mismo medio a lo largo de todo el intervalo de presión estudiado. Para las concentraciones superiores a  $0.080 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  se observa un cambio en la tendencia que sigue la atenuación a una presión dada. Este cambio en el comportamiento nos indica que el medio en el que se está transmitiendo la onda ultrasónica es diferente, y es una evidencia más de la existencia de una nueva fase micelar a altas presiones como se observó también en el caso de las medidas de velocidad del sonido. En el caso de la disolución de concentración  $0.080 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  se produce un aumento de la atenuación a partir de 300 MPa, mientras que en las disoluciones más concentradas de  $0.1000$  y  $0.1250 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  el aumento se produce a presiones superiores a 250 MPa. Por tanto, parece que en el diagrama de la Figura 5.17 estos datos siguen la tendencia representada por la línea de la transición de la Fase I.



**Figura 5.19.** Atenuación de la señal frente a la presión para diferentes concentraciones ( $m = \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Los símbolos rojos se han utilizado para representar los valores de las moléculas de NaL sin agregar. Los símbolos verdes para agregados micelares y los naranjas para la fase descrita en el texto. Cada valor se ha obtenido como un promedio de tres medidas y las barras de error representan el valor de la desviación estándar de dichas medidas.

## 5.4. Resumen y Conclusiones

- Se ha validado la metodología para la determinación de la CMC a presión atmosférica en función de la temperatura mediante las medidas de velocidad del sonido a 298.15 K. Posteriormente se ha empleado esta metodología para hacer un estudio de cómo varía la CMC en función con la temperatura desde 283.15 a 333.15 K.
- Se han obtenido valores de velocidad del sonido y densidad en un amplio intervalo de concentración y temperatura. Estas medidas se utilizarán posteriormente en el Capítulo 7 para el estudio de propiedades aparentes.

- En lo que se refiere a las medidas a alta presión y 298.15 K se han obtenido valores de velocidad del sonido que nos han permitido analizar cómo varía la CMC con la presión, ampliando el rango de presión existente en la bibliografía y proponiendo la existencia de una nueva fase denominada fase sólida hidratada, a altas presiones y concentraciones basándonos en el cambio de tendencia que sufre la atenuación de la señal a altas concentraciones y presiones.
- Las medidas de velocidad del sonido y el método de análisis de éstas nos han permitido observar que es un método válido para detectar cambios de agregación y caracterizarlos. En este caso se produce un cambio clásico a partir de una concentración dada, la CMC, y el análisis de la atenuación de la señal nos ha permitido observar cambios de agregación que la velocidad del sonido aparentemente no muestra, como la transición entre la fase micelar y la del sólido hidratado.

## 5.5. Referencias

- <sup>1</sup> Kralova I., Sjoblom J.; *J. Dispersion Sci. and Tech.* **2009**, 30, 1363-1383.
- <sup>2</sup> Chevalier Y., Zemb Th.; *Report on Progress of Physics.* **1990**, 53, 279-371.
- <sup>3</sup> Ciferri A.; *Chemistry-A European Journal*, **2010**, 16, 10930-10945.
- <sup>4</sup> Rakshit A. K.; *J. Indian Chem. Soc.* **2008**, 85, 1289-1300.
- <sup>5</sup> Murkerjee P., Mysels K. J., *NSRDS, National Standard Reference Data System, "Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems"* **1971**, p.137.
- <sup>6</sup> Goddard E. D., Harva O., Jones T. G.; *Trans. Faraday Soc.* **1953**, 64, 97.
- <sup>7</sup> Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B.; *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. John Wiley & Sons, Ltd.* **2002**, New York.
- <sup>8</sup> Offen H. W.; *Rev. Phys. Chem. Jap.* **1980**, 50, 97-118.
- <sup>9</sup> Brun T. S., Hoiland H., Vikingstad E.; *J. Coll. Int. Science* **1978**, 63, 89-96.
- <sup>10</sup> Vikingstad E., Hoiland H.; *J. Coll. Int. Science* **1978**, 64, 510-513.
- <sup>11</sup> Vikingstad E., Hoiland H.; *J. Coll. Int. Science* **1978**, 66, 240-246.
- <sup>12</sup> Brun T. S., Hoiland H., Vikingstad E.; *J. Coll. Int. Science* **1978**, 64, 126-130.
- <sup>13</sup> Winter R.; *Curr. Opin. Coll. Int. Sci.* **2001**, 6, 303-312.



- <sup>14</sup> Blanco E., González-Pérez A., Ruso J. M., Pedrido R., Prieto G., Sarmiento F.; *J. Coll. Int. Science* **2005**, 288, 247-260.
- <sup>15</sup> Huang H., Verrall R. E.; *Can. J. Chem.* **1997**, 75, 1445-1462.
- <sup>16</sup> De Lisi R., Inglese A., Milioto S., Pellerito A.; *J. Coll. Int. Science*. **1996**, 180, 174-187.
- <sup>17</sup> Crook E. H., Fordyce D. B., Trebi G. F.; *J. Phys. Chem.* **1963**, 67, 1987-1998.
- <sup>18</sup> Tanaka M., Kaneshina S., Tomida T., Noda K., Aoki K.; *J. Coll. Int. Science* **1973**, 44, 525-531.
- <sup>19</sup> Ikawa Y., Tsuru S., Murata Y., Okawauchi M., Shigematsu M., Sugihara G.; *J. Sol. Chem.* **1988**, 17, 125-137.

# ***CAPÍTULO 6***

## ***ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN DE CASEÍNAS EN MEDIO ACUOSO***

---

### **6.1 Introducción**

Este capítulo está dedicado al estudio de un grupo de proteínas auto-asociativas, las caseínas, mediante las técnicas de ultrasonidos y dispersión de luz dinámica. En primer lugar, en la introducción, se comentarán los aspectos generales sobre la agregación de proteínas como la naturaleza de los agregados, su mecanismo de agregación o las técnicas disponibles para su estudio, así como el efecto de la presión sobre las mismas. A continuación se explicarán las particularidades del sistema de estudio como son las características estructurales más significativas de las caseínas y los distintos tipos de caseínas, así como los diferentes modelos propuestos en la bibliografía para tratar de explicar la complejidad que presentan este tipo de compuestos en estado agregado. Posteriormente se explicarán brevemente qué efectos ejerce la presión y la temperatura sobre las micelas de caseína y las aplicaciones tecnológicas más destacables, tanto sobre la leche como en la agregación de proteínas.

A continuación en el apartado de metodología específica se mostrarán las características de las muestras estudiadas y las condiciones de los experimentos.

Finalmente se expondrán los resultados y las conclusiones obtenidas a partir de los experimentos de velocidad del sonido y dispersión de luz para las caseínas a presión atmosférica y a alta presión.

### **6.1.1 La agregación de proteínas**

#### **6.1.1.1 Aspectos generales**

- **Naturaleza de los agregados**

Al término agregación proteica se le han dado muchas definiciones en la literatura. Los diferentes autores definen la agregación proteica como un conjunto de proteínas de alto peso molecular denominados oligómeros o multímeros. Una proteína puede sufrir diferentes maneras de agregarse dependiendo de las condiciones del medio.

El proceso de agregación, en general, puede dar lugar a agregados solubles y/o insolubles que pueden precipitar.<sup>1,2</sup> La morfología de estos agregados insolubles puede ser amorfa o fibrilar y depende de cada proteína y su entorno o medio en el que esté. Los agregados no covalentes están formados únicamente mediante fuerzas débiles del tipo fuerzas de Van der Waals, enlace de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas,<sup>3</sup> mientras que los agregados covalentes pueden formarse, por ejemplo, por medio de puentes disulfuro a través de grupos tioles libres.<sup>4</sup> La agregación puede ser reversible o irreversible, donde los agregados irreversibles pueden ser eliminados permanentemente por procesos de separación como las técnicas de filtración. Se considera en ocasiones que la formación de agregados reversibles es causada por la autoasociación de proteínas, que pueden estar inducidos por cambios en el pH o fuerza iónica de la proteína en disolución.<sup>5,6</sup>

En la literatura, podemos encontrar diferentes clasificaciones para los agregados proteicos, siendo lo más habitual clasificarlos en función de los siguientes factores:

- a) Por el tipo de enlace: agregados no covalentes, es decir, unidos mediante fuerzas electrostáticas débiles, y agregados covalentes, unido mediante puentes disulfuro.
- b) Por la reversibilidad: agregados reversibles,<sup>7</sup> o bien, irreversibles.
- c) Por el tamaño: Agregados pequeños solubles (oligómeros) y agregados grandes de más de diez monómeros

- d) Por la conformación de la proteína: Agregados con estructura predominantemente nativa<sup>8</sup> o bien, agregados con estructura predominantemente no nativa, como por ejemplo agregados fibrilares.

- **Mecanismos de agregación**

Como se verá a lo largo del capítulo cuando se explique la estructura y propiedades de las caseínas, éstas presentan la capacidad para asociarse formando agregados supramoleculares, al igual que el NaL estudiado en el capítulo anterior. Esta capacidad para agregarse y cómo se ve afectada por diferentes factores (presión y temperatura) se abordará de modo exhaustivo a lo largo de este capítulo y el siguiente.

En la última década la agregación de proteínas ha pasado de ser un tema poco estudiado en química a convertirse en un aspecto clave tanto en ciencias médicas como en biotecnología. Se ha demostrado que la importancia biológica de la precipitación y agregación de proteínas es mucho más alta de lo que se pensaba. En primer lugar, porque la deposición de proteínas insolubles sobre tejidos humanos se correlaciona con algunos trastornos debilitantes que están en auge, como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, la diabetes tipo II y de las encefalopatías espongiformes transmisibles.

Cuando una proteína no ha sufrido ningún cambio en su interacción con el disolvente, se dice que la proteína se encuentra en su estructura nativa. La desnaturalización de las proteínas ocurre cuando se produce pérdida de alguna de las estructuras superiores (secundaria, terciaria o cuaternaria), quedando la cadena polipeptídica reducida a un polímero sin ninguna estructura tridimensional fija.

Cualquier factor que modifique la interacción de la proteína con el disolvente disminuirá su solubilidad en disolución y provocará la precipitación. Así, la desaparición total o parcial de la envoltura acuosa, la neutralización de las cargas eléctricas de tipo repulsivo o la ruptura de los puentes de hidrógeno facilitará, por tanto, la agregación intermolecular y producirá la agregación.

En una proteína, la estructura nativa y la desnaturalizada tan sólo tienen en común la estructura primaria, es decir, la secuencia de aminoácidos que la componen. La desnaturalización provoca diversos efectos en la proteína como cambios en las propiedades hidrodinámicas: aumenta la viscosidad y disminuye el coeficiente de difusión; una drástica disminución de su solubilidad, ya que los residuos hidrofóbicos

del interior aparecen en la superficie, y por último pérdida de las propiedades biológicas.

La desnaturalización de una proteína se puede producir mediante agentes desnaturalizantes físicos (calor) o químicos (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica). Como en algunos casos el fenómeno de desnaturalización es reversible, es posible precipitar proteínas de manera selectiva mediante cambios en la polaridad del disolvente, fuerza iónica, pH o temperatura. Así, un aumento de la fuerza iónica del medio, por adición de NaCl por ejemplo, también provoca una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que este soluto compite por el agua y rompe los puentes de hidrógeno o altera las interacciones electrostáticas de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan. En muchos casos, la precipitación provocada por el aumento de la fuerza iónica es reversible. Mediante una simple diálisis se puede eliminar el exceso de soluto y recuperar tanto la estructura como la función original. A veces, es una disminución de la fuerza iónica la que provoca la precipitación. Así, las proteínas que se disuelven en medios salinos pueden desnaturalizarse al dializarlas frente a agua destilada, y se renaturalizan cuando se restaura la fuerza iónica original.

En el caso de la variación del pH, los iones hidronio e hidroxilo provocan efectos parecidos, pero además de afectar a la envoltura acuosa de las proteínas también afectan a la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y a menudo provocan su agregación. La solubilidad de una proteína es mínima en su punto isoeléctrico, puesto que su carga neta es cero y desaparece cualquier fuerza de repulsión electrostática que pudiera dificultar la formación de agregados.

En lo que se refiere a la temperatura, cuando ésta aumenta, lo hace también la energía cinética de las moléculas con lo que se desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas, pudiendo llegar a desnaturalizarse. Asimismo, un aumento de la temperatura destruye las interacciones débiles y desorganiza la estructura de la proteína, de forma que el interior hidrofóbico interacciona con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada.

Conviene distinguir entre precipitados, en los que las proteínas nativas mantienen su conformación plegada, y agregados, en los que las proteínas adoptan nuevas estructuras no nativas. El primer tipo de autoasociación se genera al azar en proteínas nativas debido a cambios en el medio, como por ejemplo reducción de la

solubilidad en la cadena polipeptídica debida a la adición de sulfato amónico. La disminución de la fuerza iónica o la variación del pH producen la disolución inmediata de estos precipitados.

La agregación de proteínas ha sido por mucho tiempo considerado un proceso inespecífico, producido por las interacciones entre proteínas total o parcialmente plegadas para formar un precipitado desordenado. Esta idea se desarrolló debido a la gran variedad de morfologías diferentes que presentan los agregados que se han observado mediante técnicas como microscopía electrónica (*EM*) o microscopía de fuerza atómica (*AFM*).

- **Técnicas de estudio**

Uno de los mayores retos en el análisis de agregados proteicos es que actualmente no existe un método sencillo para cubrir por completo el intervalo de tamaño en el que pueden presentarse los agregados proteicos. Estos agregados proteicos pueden constituir únicamente una fracción ínfima del total de masa proteica y puede ser de especial interés, por ejemplo, debido a su papel en la inmunogenicidad.<sup>9</sup>

Las técnicas que se utilizan habitualmente para estudiar la agregación proteica son la cromatografía por exclusión de tamaño (*SEC*), electroforesis, ultracentrifugación analítica, turbidimetría, técnicas de dispersión de luz, ya sea estática o dinámica, microscopía de transmisión electrónica (*TEM*) y microscopía de fuerza atómica (*AFM*), entre otras técnicas analíticas.

Para controlar la agregación de proteínas es importante entender el origen de su formación y disponer de las técnicas de análisis adecuadas. Por tanto, es la combinación de métodos lo que permitirá obtener información completa acerca de las proteínas y sus fenómenos de agregación.

### **6.1.1.2 Factores que inducen la agregación de proteínas**

La agregación de proteínas puede ocurrir fácilmente bajo una gran variedad de condiciones como una elevada concentración de proteínas, temperatura, estrés mecánico etc., y estas condiciones pueden tener influencia en la forma, velocidad, tamaño y estructura del agregado proteico. Estas condiciones se producen durante la producción de proteínas, incluyendo los procesos de fermentación, purificación, envase, transporte y almacenaje. El control de la formación de agregados es esencial, puesto que algunos agregados proteicos son potenciales causantes de respuestas

inmunes que pueden tener un efecto adverso para la salud. Sin embargo, considerando las amplias condiciones en las que una proteína podría agregarse y el rango de detección de las técnicas analíticas de las que se dispone, no es probable que ningún producto biotecnológico esté libre al 100 % de cualquier agregado proteico detectable.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la agregación puede ser inducida por una gran variedad de fenómenos, como temperatura, estrés mecánico como la agitación, procesos de congelación y descongelación. La agregación también puede ocurrir bajo condiciones de no estrés cuando el estado nativo está altamente favorecido. A continuación se comentan brevemente algunos de los factores que afectan a la agregación de proteínas y algunos de los efectos más notables que ejercen sobre este proceso.

- a) Temperatura:** Un incremento en la temperatura acelera la cinética de las reacciones químicas como por ejemplo la oxidación y, a su vez, puede llegar a producir altos niveles de agregados.<sup>10</sup> La alta temperatura también afecta a la conformación de las cadenas polipeptídicas a nivel de estructura cuaternaria, terciaria y secundaria. La temperatura de fusión varía de unas proteínas a otras, pero normalmente está comprendida en el rango de 313.15 a 353.15 K.
- b) Congelación y descongelación:** La congelación produce cambios como la creación de nuevas interfases hielo-disolución,<sup>11,12</sup> adsorción a las paredes del contenedor, crioconcentración de la proteína y los solutos,<sup>13</sup> y cambios de pH debidos a la cristalización de los componentes de la disolución reguladora.<sup>14</sup> Se considera que estos efectos son los causantes de la desnaturalización y agregación de proteína inducida por congelación.
- c) Estrés mecánico:** Dentro de este fenómeno quedan enmarcados los procesos de agitación y bombeo durante la manufactura y el transporte. Estos tipos de estrés pueden inducir cizallamiento, efectos interfaciales, cavitación, efectos térmicos locales y transporte rápido de agregados o especies adsorbidas desde la interfase a la disolución. Se ha descrito en la literatura que la agitación es una de las posibles causas de la cavitación,<sup>15</sup> este fenómeno consiste en la formación rápida de burbujas dentro del seno del líquido que rápidamente colapsa produciendo ondas de choque, condiciones de régimen turbulento, presiones y temperaturas extremas que pueden producir la formación de radicales hidroxilo y la formación de agregados proteicos.<sup>16,17</sup>

**d) Efectos superficiales y de disolvente:** Los cambios en el entorno del disolvente de la proteína, como por ejemplo, el pH, la fuerza iónica, las especies de la disolución reguladora entre otros pueden inducir la formación de agregados proteicos. Un cambio en el pH tiene una gran influencia en la velocidad de agregación puesto que el pH determina las interacciones electrostáticas por medio de la distribución de cargas en la superficie de las proteínas<sup>18</sup>. Estas modificaciones dependen de la estructura primaria, es decir, la secuencia de aminoácidos y pueden producir un aumento de la agregación.

La cantidad de excipientes en el disolvente tiene también un impacto en el comportamiento de la agregación. Además, también se ha observado que la capacidad de los surfactantes, como por ejemplo los polisorbatos, para estabilizar una proteína contra la agregación depende de la relación de surfactante y proteína.

Además, el material de contacto, como el vidrio, acero, silicona, plásticos, gomas etc pueden influir en la agregación.<sup>19</sup>

**e) Modificaciones químicas de la proteína:** Estas modificaciones pueden ser reacciones de desamidación, isomerización, hidrólisis y oxidación.<sup>20</sup> Las modificaciones de las cadenas laterales de aminoácidos, como por ejemplo desamidación o isomerización, pueden distorsionar la conformación de las proteínas<sup>21</sup> conduciendo a la agregación o la autoasociación.

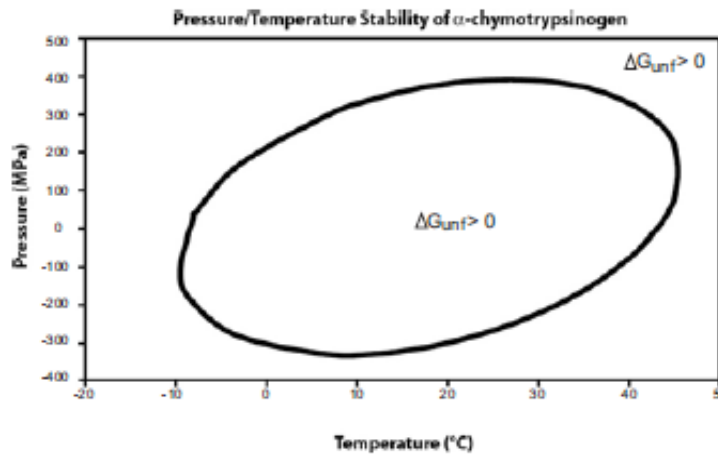
#### 6.1.1.3 Efecto de la presión sobre la agregación de proteínas

La alta presión hidrostática ha sido utilizada como una herramienta para modular la estabilidad conformacional de proteínas y tratar de comprender el comportamiento de los procesos de agregación. El pionero en estos trabajos fue Bridgman, que demostró que la alta presión podía ser utilizada para desnaturalizar ovoalbúmina.<sup>22</sup> Desde ese momento, la alta presión hidrostática se ha utilizado para el estudio de los mecanismos de plegamiento y estabilidad de numerosas proteínas.<sup>23,24,25</sup>

Para la mayoría de los procesos en estado sólido o líquido, los cambios de volumen son generalmente pequeños y por tanto, los efectos cinéticos y termodinámicos de la alta presión son mínimos.<sup>26</sup> Sin embargo, con aplicación de suficiente presión, se puede modificar la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas.<sup>27</sup>



Al igual que para sustancias simples se puede tener un diagrama de fases en función de la presión y la temperatura, para el caso de las proteínas, también es posible representar estos diagramas en función de estas dos variables. En el caso de las proteínas, el diagrama tiene forma elíptica como se muestra en la Figura 6.7, y los valores de presión y temperatura que quedan dentro de la elipse corresponden con los valores en los que la proteína se encuentra en su conformación nativa, mientras que las condiciones de fuera de la elipse producen la desnaturalización de la proteína. La curvatura de la elipse surge del cambio en la capacidad calorífica,  $\Delta C_p$ , y el cambio en la compresibilidad,  $\Delta \kappa$ , de la proteína al someterse a desnaturalización.<sup>28,29</sup> La desnaturalización por presión afecta en mayor grado a la estructura secundaria comparada con el tratamiento térmico o químico, mientras que el enlace de hidrógeno no se afecta durante el tratamiento a alta presión.<sup>30,31</sup>



**Figura 6.7.** Diagrama presión – temperatura para el  $\alpha$ -quimitripsinógeno. Las presiones y temperaturas dentro de la elipse son las que permiten la conformación nativa de la proteína, mientras que las condiciones de fuera producen la desnaturalización de la proteína. Figura tomada de la Ref. [32].

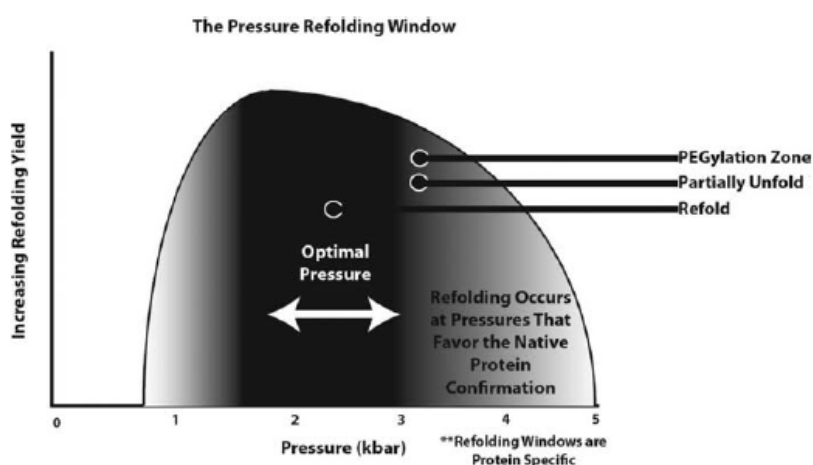
Se ha propuesto en varios estudios, que la desnaturalización de proteínas mediante presión se produce mediante la salida de moléculas de agua del interior del núcleo hidrofóbico de la proteína en lugar de exponiendo los grupos hidrofóbicos al disolvente.<sup>33,34,35</sup>

Puesto que los tratamientos a alta presión favorecen las reacciones que disminuyen el volumen del sistema, se puede deducir que estos tratamientos a alta presión favorecen la disociación de los agregados y la consiguiente formación de estructuras más compactas.

$$\left( \frac{\partial K}{\partial P} \right)_{T,n} = - \frac{\Delta V}{RT} \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Mecánísticamente, se cree que el tratamiento a alta presión disocia los agregados por la inserción de moléculas de agua dentro de los espacios hidrofóbicos proteína-proteína.<sup>36,37</sup> Esta hipótesis se ha desarrollado por comparación de la compresibilidad adiabática de los agregados respecto a las proteínas en estado nativo, con simulaciones computacionales de las interacciones agua-metano en función de la presión<sup>38,39</sup> y el análisis de los cambios en el índice de refracción en función de la concentración a presiones elevadas. Se ha visto que la compresibilidad adiabática se puede relacionar con la hidrofobicidad.<sup>40</sup> Además, los tratamientos a alta presión producen la rotura de los puentes salinos,<sup>41</sup> sin embargo, este efecto es normalmente de menor importancia que los efectos hidrofóbicos. En cambio, los enlaces de hidrógeno y las estructuras secundarias no se ven afectadas por presiones elevadas.<sup>42,43</sup> Hay estudios que sugieren que los enlaces de hidrógeno son las fuerzas que contribuyen en mayor medida a la estabilidad de las proteínas.

El segundo coeficiente del virial,  $B_{22}$ , proporciona una medida de las interacciones proteína-proteína, determinada a partir del comportamiento no ideal de las disoluciones proteicas.<sup>44</sup> Los valores de  $B_{22}$ , que miden la estabilidad coloidal, demuestran por ejemplo que el tratamiento a 2000 bar disminuye las interacciones proteína-proteína de las lisozimas T4. El máximo replegamiento se observa en torno a presiones de 2000 bar como se puede observar en la Figura 6.8, donde las interacciones de los agregados están desfavorecidas, mientras que la conformación nativa está favorecida. A medida que la presión aumenta, la conformación nativa comienza a desestabilizarse, inhibiendo el replegamiento, pero en algunos casos permitiendo reacciones que requieren la desnaturalización parcial.



**Figura 6.8.** Presiones de alrededor de 2 kbar suelen ser efectivas para producir la disociación de agregados proteicos, mientras que mantienen la conformación nativa. La presión de 2 kbar es a veces efectiva para producir el replegamiento, ya que se cree que esta es la presión a la que empiezan a romperse las interacciones hidrofóbicas. Las presiones más altas pueden desnaturalizar parcialmente la proteína. Figura tomada de la Ref. [32].

#### 6.1.1.4 Importancia del fenómeno de agregación de proteínas en ciencias

El estudio del fenómeno de agregación de proteínas está presente en numerosos ámbitos científicos, puesto que su precipitación o formación de agregados modifican de forma extraordinaria sus propiedades y funcionalidad. Así por ejemplo, en el campo de la medicina, el estudio de los agregados proteicos se lleva realizando varios años, principalmente a raíz de que los primeros estudios que demostraron que la presencia de depósitos de proteínas insolubles en los tejidos humanos se podían relacionar directamente con la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, diabetes tipo II y encefalopatías espongiformes transmisibles, enfermedades todas ellas graves y que causan un deterioro irreversible del enfermo.

En farmacia se estudia la agregación de proteínas en el campo de las vacunas puesto que resulta fundamental controlar las condiciones de estabilidad de las mismas. Se trata de productos caros y que se deben inyectar en el organismo por lo que se deben extremar las precauciones y conocer cómo se comportan con el tiempo de almacenaje y las condiciones de temperatura. Por tanto, resulta fundamental controlar aspectos como la agregación y estabilidad de las proteínas que las constituyen.

En el campo de la ciencia y tecnología de los alimentos, la agregación de proteínas está detrás de los cambios de textura que se producen por efecto de la temperatura, como por ejemplo la agregación de la ovoalbúmina del huevo al freírlo. Estos cambios en la agregación de proteínas para la modulación de la textura o estabilización de productos también se pueden llevar a cabo mediante alta presión (HPP, *high pressure process*). Estos nuevos tratamientos son alternativos a los térmicos, produciendo en muchos casos que se mantengan las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos con una calidad mayor que en el caso de los tratamientos térmicos. Al igual que el tratamiento térmico, también se produce la inactivación de microorganismos produciendo alimentos aptos para el consumo.

En este campo, la agregación de proteínas también está detrás de la inactivación de enzimas puesto que fenómenos como la agregación o precipitación producen cambios de conformación que causan la pérdida de la funcionalidad de la enzima.

### 6.1.2 Sistema de estudio: las caseínas

En este bloque se explicarán las principales características del sistema al que está dedicado este capítulo: las caseínas. En primer lugar se comentarán sus características estructurales y su composición química. Posteriormente se pondrá de relieve la complejidad estructural de las micelas de caseína a partir de los diferentes modelos propuestos en la bibliografía. Finalmente se verán algunas de las aplicaciones tecnológicas de las caseínas en la industria y cómo se modifican sus características por diferentes tratamientos.

#### 6.1.2.1 Características principales

Las proteínas de la leche son las que hace más tiempo y en mayor cantidad consume el ser humano. La leche de vaca es la mejor conocida y su producción la más importante puesto que se usa para reemplazar la leche humana tras la lactancia materna y como alimento esencial para los adultos.

En una leche normal el contenido promedio de proteína es de 30 a 35 g por mil, lo que representa el 95 % del nitrógeno total de la leche. En torno al 80 % de las proteínas se encuentran bajo la forma moléculas complejas y conteniendo fosfato de calcio, entre ellas destacamos las micelas de caseína.

La caseína se encuentra presente en la leche pero también en algunos de sus derivados como son los productos fermentados tales como el yogur o el queso. En la leche, se encuentra en la fase soluble asociada al calcio (fosfato de calcio) en un complejo denominado caseinógeno. En la Tabla 6.1 se muestra el contenido proteico y caseínico presente en la leche de varias especies.

**Tabla 6.1.** Contenido proteico y caseínico presente en la leche de varias especies.

Componente	Especie			
	Humana	Bovina	Ovina	Caprina
Proteínas (% del total lácteo)	1.3 – 1.5	3.2 – 3.5	5.4 – 6.0	3.1 – 4.0
Caseínas (% del total proteico)	44.9	82.5	84.8	81.3

Las caseínas están presentes fundamentalmente en forma de micelas y contienen hasta un 8 % de minerales y tienen naturaleza ácida, por ser ricas en ácido glutámico y aspártico.

Existen cuatro tipos de caseínas: caseína  $\alpha_{s1}$ , caseína  $\alpha_{s2}$ , caseína  $\beta$  y caseína  $\kappa$ . También existe otro tipo de caseína, denominando caseína  $\gamma$  que se produce por fragmentación de la caseína  $\beta$  por acción de la plasmina. Alrededor del 80 % de la proteína de la leche es caseína y ninguna otra proteína natural se parece a ella. La caseína  $\kappa$  es la única que sirve como coloide protector que preserva a las micelas de la agregación, de no existir, la leche presentaría una consistencia parecida a la del requesón.

A continuación en la Tabla 6.2 se muestran los contenidos en tanto por ciento de caseína para la leche de varias especies.

**Tabla 6.2.** Porcentaje de caseínas en la leche de distintas especies.

<b>Especie</b>	<b>Caseína <math>\alpha_{s1}</math></b>	<b>Caseína <math>\alpha_{s2}</math></b>	<b>Caseína <math>\beta</math></b>	<b>Caseína <math>\kappa</math></b>
Cabra	5 a 17	6 a 20	50	15
Vaca	38	10	40	12
Humana	Trazas	Trazas	70	27

Su estructura y composición es altamente compleja, pero todas ellas tienen una característica común: precipitan cuando se acidifica la leche a pH 4.6. Por ello, a la caseína también se le suele denominar proteína insoluble de la leche. La falta de organización de las moléculas de caseína ha hecho que hasta el momento ninguna haya podido cristalizarse para llevar a cabo estudios detallados de su estructura secundaria y terciaria. Los distintos tipos de caseína se encuentran en todas las especies estudiadas hasta el momento, aunque su proporción varía ampliamente según la especie.

A continuación en la Tabla 6.3 se presentan algunas de las características fisicoquímicas de las caseínas bovinas.

**Tabla 6.3.** Algunas de las características fisicoquímicas de las caseínas bovinas.

Característica	Caseína $\alpha_{s1}$	Caseína $\alpha_{s2}$	Caseína $\beta$	Caseína $\kappa$
Concentración en leche (g/L)	12 – 15	3 – 4	9 – 11	2 – 4
Masa Molecular	23545 – 23615	25226	23983 – 24023	19006 – 19037
Punto Isoeléctrico	4.44 – 4.76	-	4.83 – 5.07	5.45 – 5.77
Restos de aminoácidos	199	207	209	109

### 6.1.2.2 Los agregados de caseínas

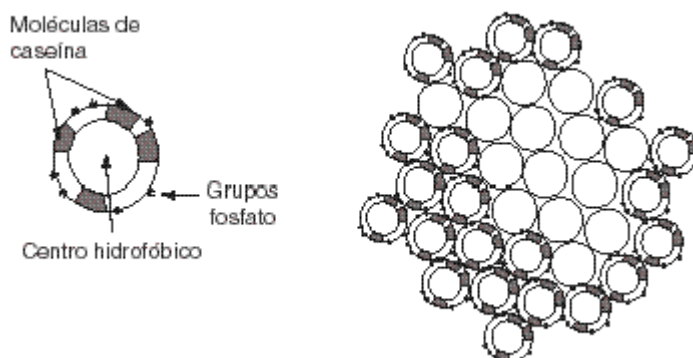
En esta tesis se van a estudiar dos tipos de agregados caseínicos diferentes: las caseínas procedentes de leche de vaca desnatada pasteurizada y las caseínas procedentes de disoluciones acuosas de caseinato de sodio. La diferencia que existe entre ambos tipos de agregados es la presencia de fosfato cálcico coloidal (CCP). Este complejo se encuentra exclusivamente en el caso de las caseínas de la leche y no en el caso de las disoluciones acuosas de caseinato de sodio. El CCP es el encargado de proporcionar estabilidad a los agregados caseínicos en la leche llamados micelas de caseína.

- **La micela de caseína**

La micela de caseína constituye un sistema coloidal muy estable en la leche. Este hecho tiene importantes implicaciones prácticas relacionadas con la formación de los geles de caseína, así como con la estabilidad de los productos lácteos durante su tratamiento térmico, concentración y almacenamiento. Por este motivo, la microestructura de la micela de caseína ha sido intensamente estudiada durante las últimas cinco décadas. A pesar de ello, existen todavía muchas incógnitas sobre su estructura y estabilidad como se refleja en los resultados derivados de recientes investigaciones basadas en el empleo de novedosas técnicas analíticas.

Las caseínas interactúan entre sí formando una dispersión coloidal que consiste en partículas esféricas denominadas micelas con un diámetro que suele variar de 60 a 450 nm, siendo el tamaño promedio de 130 nm. Las micelas de caseína están formadas por la asociación de moléculas de caseína junto con fosfato cálcico en forma coloidal, y contienen el 80 % de la proteína total de la leche.<sup>45</sup> El componente

“mineral” representa alrededor del 7 % del peso de la caseína y está formado principalmente por fosfato cálcico coloidal. Las micelas de caseína exhiben una estructura porosa, muy voluminosa ( $4 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  de caseína), fuertemente hidratada (3.7 g de agua por cada gramo de caseína)<sup>46</sup> y con un potencial eléctrico<sup>47</sup> de -14 mV.



**Figura 6.9.** Esquema de la estructura de una micela de caseína.

- **Interacciones y características morfofuncionales de las caseínas**

La formación de las micelas de caseína depende de los fenómenos de interacción que se establecen entre ellas, en presencia del ion calcio. La composición y estructura primaria de las caseínas les confieren importantes propiedades físico-químicas de interés funcional,<sup>48</sup> como un marcado carácter aniónico en medio neutro por la presencia de radicales fosfoserina y/o ácido glutámico, insolubilidad en agua a pH por debajo de 4.6 por la elevada proporción de radicales apolares y la agregación en medio cálcico de las caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$  por disminución de su carga eléctrica negativa y su hidrofilia, como consecuencia de la complejación del catión calcio por parte de los radicales fosfoserina presentes en la estructura de dichas caseínas. Este comportamiento corresponde a las caseínas consideradas de forma aislada, pero en presencia de caseína  $\kappa$  en proporción suficiente, cercana al 10 %, las demás caseínas son solubles en presencia de calcio.

En soluciones puras, a pH neutro y en ausencia de calcio las caseínas presentan tendencia a polimerizar en distinto grado según el tipo de caseína de que se trate, mayor en el caso de las caseínas  $\beta$  y  $\kappa$ , en las que la repartición desigual de las cargas les confiere características detergentes.<sup>48</sup> En medio acuoso se asocian a través de enlaces hidrofóbicos, lo que se traduce en la repulsión de las zonas hidrofílicas hacia el exterior de los polímeros caseínicos.

La estructura primaria de las caseínas revela otra característica singular de estas proteínas, la distribución de residuos hidrofóbicos y polares. La agrupación de los residuos polares y de los hidrofóbicos en regiones separadas de la secuencia primaria sugiere la formación de distintos dominios de naturaleza polar e hidrofóbica, que genera una estructura anfipática. En disoluciones aisladas de caseínas, tanto la caseína  $\beta$  como la  $\kappa$  se asocian para formar grandes complejos esféricos muy similares a una micela tradicional de surfactante. Precisamente, los dominios polares de las caseínas sensibles al calcio son los que presentan una alta proporción de residuos fosfoserilo que, al pH de la leche, aportan una carga negativa neta.

La estructura interna de las micelas de caseína, si es que realmente puede hablarse de una estructura organizada, está en discusión. A pesar de la abundante literatura científica sobre la posible estructura de una micela, no hay consenso sobre la misma. La multitud de modelos diferentes que han sido propuestos sobre la estructura de la micela de caseína constituyen una evidencia clara de la ausencia de conocimientos sólidos.<sup>49</sup> La mayoría de los modelos propuestos para la micela de caseína se clasifican en tres categorías:<sup>50,51</sup> de núcleo y corteza, de subunidades y de estructura interna. A continuación se comentarán los aspectos más destacados de los distintos modelos planteados para explicar la estructura de la micela de caseína.

#### **a) Modelos de núcleo y corteza**

La mayoría de los modelos propuestos dentro de la categoría de núcleo y corteza se basan en estudios fisicoquímicos y consideran que la micela de caseína es una partícula esférica y liófila constituida por un centro interno e hidrofóbico de proteínas (núcleo) rodeadas por una cobertura anfifílica (corteza), cuyas proteínas son diferentes a las que constituyen el centro.

En los modelos de núcleo y corteza, la corteza jugaría un papel protector frente al proceso de agregación micelar.

#### **b) Modelos de subunidades**

Estos modelos han sido los más aceptados hasta más recientemente.<sup>52,53</sup> Consideran que la micela de caseína está dividida en subunidades individuales denominadas submicelas, que pueden tener una composición idéntica o variable entre sí. La existencia de submicelas se ha fundamentado ampliamente en base a métodos físico-químicos<sup>51,54,55</sup> como la disociación de las micelas en submicelas o el análisis de las submicelas de caseinato sódico y su sucesivo crecimiento por adición de calcio. La estructura submicelar también ha sido defendida mediante la observación con



microscopía electrónica<sup>56,57,58</sup> y estudios con dispersión de neutrones.<sup>59</sup> Las submicelas se encontrarían unidas entre sí a través de puentes de fosfato y fundamentalmente por efectos hidrofóbicos.

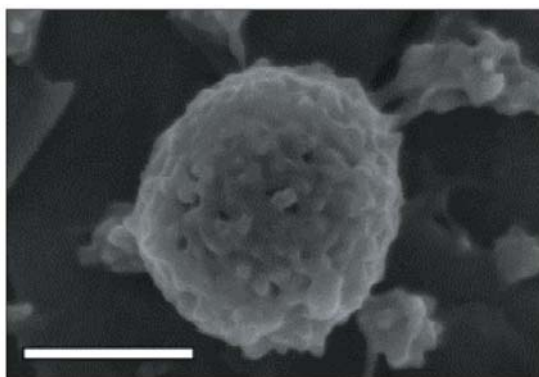
Estudios realizados mediante dispersión de rayos X sobre micelas de caseína y de caseinato sódico determinan dentro de las mismas una zona interior con una mayor densidad electrónica formada por cadenas hidrofóbicas mientras que hacia el exterior las áreas son hidrofílicas, con una menor densidad electrónica y con protrusiones de caseínas  $\kappa$  hacia el exterior.

Los trabajos de Povey y col.<sup>60</sup> empleando la técnica de espectroscopía de ultrasonidos determinaron un tamaño submicelar de 20 nm. La estructura interna de la submicela de caseína se mantendría principalmente mediante interacciones hidrofóbicas que se establecen entre las moléculas de caseína individuales,<sup>46,47</sup> mientras que las submicelas interactuarían por la incorporación de los agrupamientos de fosfoserilo aniónicos a las estructura del fosfato cálcico coloidal.<sup>46</sup>

### **c) Modelos de estructura interna**

Estos modelos consideran que la estructura en el interior de las micelas está poco organizada. Ven a la micela de caseína como una red proteica, tridimensional, porosa y mineralizada. La asociación de moléculas de caseína se produciría por su interacción con partículas de fosfato cálcico coloidal de tamaño nanométrico, del orden de 2.5 nm, en forma no cristalina, es decir, con estructura amorfa. Estos “nanoclusters” de fosfato cálcico estarían distribuidos dentro de una partícula más o menos homogénea formada por la asociación de caseínas individuales. La superficie exterior de la micela sería también cambiante, especialmente sensible a las modificaciones del medio que alteraran la hidratación de las moléculas. Las evidencias que respaldan este tipo de modelos provienen fundamentalmente de análisis químicos y de microscopía electrónica.

Este modelo no asigna un papel importante al fosfato de calcio coloidal, que estaría implicado simplemente como nexo de unión intramicelar. Los modelos de estructura interna no tuvieron gran aceptación a partir de los años setenta. Sin embargo, como resultado de recientes controversias generadas en relación con los modelos de subunidades, Holt<sup>61</sup> y Horne<sup>62</sup> (1998) han reconsiderado los modelos de estructura interna y proponen modelos originales alternativos incluidos en esta categoría.



**Figura 6.14.** Micrografía electrónica de una micela de caseína obtenida por Dagleish y col.<sup>63</sup> Se puede apreciar la estructura porosa que presenta la micela de caseína.

### 6.1.2.3 Los agregados de caseínas en disoluciones de caseinato

Como vemos la estructura de las micelas de caseína es enormemente compleja, y han sido numerosos autores y grupos de investigación los que han dedicado grandes esfuerzos durante años para tratar de elucidar la estructura de estos agregados y sus propiedades. Estas estructuras supramoleculares han sido estudiadas por numerosas técnicas, cada una de ellas con sus ventajas y desventajas, como son medidas de velocidad del sonido, viscosidad, resonancia magnético nuclear (RMN), difracción de rayos X, osmometría. Pero quizás la técnica que ha permitido aportar más información acerca de la estructura y el comportamiento de los agregados caseínicos sea la dispersión de luz.

Así, por ejemplo, se han hecho estudios sobre la estructura y las propiedades de suspensiones de caseinato mediante viscosimetría.<sup>64</sup> Mediante esta técnica se ha encontrado que la viscosidad aumenta de forma considerable por encima de cierta concentración,  $C_c$ , debido a la interferencia de los agregados. Esta  $C_c$  depende poco del pH y de la fuerza iónica. La repulsión entre los agregados caseínicos aumenta al disminuir la temperatura y produce aglomerados a bajas concentraciones. Por tanto la viscosidad disminuye drásticamente al aumentar la temperatura para disoluciones concentradas.

Mediante dispersión de luz se han estudiado disoluciones diluidas y se ha observado que el caseinato de sodio se asocia formando pequeños agregados bien definidos con un número de agregación que depende de las condiciones del medio como la temperatura, el pH, o la fuerza iónica.<sup>65,66,67</sup> Se postula, a la vista de los resultados de los experimentos, que los agregados están formados por un centro hidrofóbico y una corona hidrofílica cargada. Para fuerzas iónicas muy bajas, se encuentra que el grado de agregación para bajas concentraciones de caseína es muy

pequeño, y las medidas de SAXS muestran que la estructura a altas concentraciones es muy poco dependiente de la fuerza iónica.

El efecto de la temperatura en la dependencia con la concentración de la viscosidad se puede entender en términos de un volumen efectivo de partículas de caseinato que aumenta al disminuir la temperatura. La altísima dependencia a altas concentraciones se debe a la ligera disminución del volumen efectivo de los agregados, inferior al 40 % entre 283.15 y 363.15 K.

Podemos resumir los resultados de los experimentos de dispersión de luz dinámica y estática recogidos en la bibliografía para las disoluciones de caseinato de sodio en función de la fuerza iónica (de 3 a 500 mM de NaCl), el pH (de 5 a 8) y la temperatura (de 283.15 a 343.15 K) en que el radio hidrodinámico,  $R_H$ , es de alrededor de 65 nm y es independiente de la fuerza iónica, el pH y la temperatura. El caseinato está presente en forma de moléculas individuales a bajas fuerza iónica (3 mM), pero forma pequeños agregados de  $R_H$  de unos 11 nm a altas fuerzas iónicas (superiores a 100 mM). El número de agregación,  $N_{agg}$ , aumenta ligeramente al disminuir el pH entre 8 y 6, pero la adición de un ácido produce la agregación por debajo de pH = 5.4 a 250 mM y por debajo de pH = 6 a 3 mM.  $N_{agg}$  aumenta reversiblemente al aumentar la temperatura.

#### 6.1.2.4 Usos de las caseínas en la industria

En Estados Unidos, la fabricación de caseinatos se desarrolló industrialmente a lo largo de los años cincuenta y sesenta. Ya en 1870, el químico sueco Haammarsten había constatado que la caseína precipitada en un ácido, podía volver a solubilizarse por medio de la adición de una base. Se trata, por tanto, de volver al pH inicial de la caseína en la leche, que es aproximadamente de 6.5. En función del empleo que se les vaya a dar en la industria alimentaria, farmacéutica u otra, los fabricantes producen diferentes caseinatos utilizando distintas bases. La Directiva del Consejo del 25-7-83 de la UE (B.O.C.E. del 26/8) permite el empleo de los agentes neutralizantes y tampones opcionales siguientes: hidróxidos, carbonatos, fosfatos o citratos de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio. El empleo de estas bases permite obtener los caseinatos correspondientes y, eventualmente, caseinatos mixtos por combinación de varios. Los dos tipos de caseinatos más utilizados en la industria son el caseinato cálcico y el caseinato sódico, este último utilizado en esta tesis.

A finales de la década de los 60 del siglo pasado, las técnicas de extracción, separación y purificación de la caseína pasaron del estado artesanal al industrial. En

Nueva Zelanda, Países Bajos, Irlanda, Alemania y Francia se instalaron fábricas que podían transformar de 500 a 1000 toneladas de leche desnatada por día. La producción mundial anual de caseína y de caseinato se sitúa entre las 150 y las 300.000 toneladas. En 1983 fue de unas 200.000 toneladas y en 2004 de alrededor de 250.000 toneladas. Los principales países productores son Nueva Zelanda, Francia, Países Bajos, Alemania, Australia, Argentina e Irlanda. Los países de la Europa de Este también son productores importantes, en especial Rusia y Polonia. La producción de caseína y caseinatos de la Unión Europea oscila en torno a las 100.000 toneladas, de las cuales Francia produce el 35 %, los Países Bajos el 20 %, Alemania el 20 %, Irlanda el 20 % y Dinamarca el 8 %. A pesar de los avances realizados en el campo de la centrifugación y las técnicas de ultrafiltración, no se puede obtener una caseína relativamente pura sin haberla precipitado previamente, obteniendo una suspensión de caseína en el lactosuero, con lo que una simple operación de separación mecánica es suficiente entonces para su extracción.<sup>68</sup> La caseína y los caseinatos se pueden obtener por vía química y físico-química, a partir de la caseína ácida, por vía fermentativa utilizando bacterias lácticas como la caseína láctica, y por vía enzimática por medio de la caseína cuajada. La fabricación del caseinato se hace a partir de la caseína ácida o láctica. Una vez insolubilizada la caseína, se puede extraer y purificar, aunque este estado insoluble impide su utilización en numerosos campos en los que se necesita una caseína soluble, el caseinato.

Cuando la leche se acidifica hasta pH 4.6, el fosfato de calcio se disocia de las micelas de caseína y deteriora la estructura micelar, provocando que la caseína se agregue y precipite. El tratamiento de ese precipitado con hidróxido cálcico o hidróxido sódico da lugar a los correspondientes caseinatos. Posteriormente, se lleva a cabo un secado para estabilizar el caseinato que se presenta en forma de polvo blanco.

Los productos lácteos forman una parte muy importante de la dieta humana, siendo la producción mundial total de leche de vaca en 2012 de aproximadamente 750 millones de toneladas. La leche en sí es una mezcla relativamente compleja, siendo los constituyentes principales, como ya se ha mencionado, grasa, minerales, azúcar (lactosa) y proteínas. Las proteínas están presentes en la leche en una concentración de aproximadamente  $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y pueden dividirse en dos clases principales: las caseínas, que quedan retenidas en la cuajada, y las proteínas de suero, que se mantienen en el líquido residual durante la fabricación del queso.

Se estimó que la producción mundial de queso fue de alrededor de 21 millones de toneladas en 2011. Cada vez se consumen más proteínas de leche, no como leche

líquida, sino como ingredientes en productos que se han procesado en un mayor o menor grado. El grado de procesamiento varía desde yogurt y fabricación de queso casero hasta la incorporación de fracciones de proteínas de leche en salsas y cremas para untar.

En la alimentación especial, la caseína sirve para la elaboración de preparados médicos y concentrados proteicos destinados a la alimentación de deportistas, especialmente después de su entrenamiento. Así se ha observado que la digestión de las caseínas es más lenta que la de las lactoproteínas solubles (también denominadas seroproteínas) y, por ello, más apropiada para reparar el anabolismo de los aminoácidos durante el periodo que sigue a una comida.

Pero las caseínas además de usarse directamente en la elaboración de productos alimentarios (derivados lácteos y cárnicos, panes y productos de repostería, etc.) la caseína se usa industrialmente en la elaboración de productos no alimentarios como pegamentos y pinturas o plásticos. Otros usos tecnológicos son la clarificación de vinos o como ingrediente en preparados de biología molecular y microbiología (medios enriquecidos para el cultivo bacteriano).

Las caseínas tienen aplicaciones tecnológicas como uso en envoltura dada su capacidad para formar películas y su alta adherencia, por tanto se usan para la fabricación de pinturas, tintas, dar acabados a cueros. Como adhesivo y puesto que tienen una alta manejabilidad, fuerza de adhesión y resistencia al agua, se pueden usar como colas con base acuosas. En lo que se refiere a su uso como aditivo para plásticos los caseinatos se emplean debido a su buen procesado, su resistencia mecánica y al agua. Así, se usan en la fabricación de plásticos rígidos, plásticos desechables o plásticos para envoltura de embalaje. Por último las caseínas se usan en la fabricación de surfactantes puesto que sus disoluciones hacen que varíe la tensión superficial y le confieren estabilidad a la interfase, por tanto pueden ser utilizadas en la fabricación de detergentes dada su capacidad surfactante.

#### **6.1.2.5 Influencia del proceso sobre las características de las caseínas**

La dispersión de la luz en las micelas de caseína da a la leche su apariencia blanca característica. La integridad de las micelas de caseína es crucial para la estabilidad de la leche y las propiedades de los productos preparados a partir de la leche están determinadas, en parte, por las propiedades de las micelas. Por ejemplo, se sabe que la firmeza de los quesos puede relacionarse directamente con el diámetro promedio de las micelas en la leche a partir de la cual se preparan. En condiciones

normales de pH y concentración de sales, pH entre 6.6 y 6.8 y 0.72 g de sales por cada 100 g de leche, las micelas de caseína se encuentran muy hidratadas, teniendo ligados alrededor de 3.7 g de agua por cada gramo de proteína. Las micelas de caseína se desestabilizan fundamentalmente por dos procesos: por el descenso del pH y por la proteólisis de la caseína.

La acidez tiene dos efectos: en primer lugar, según va bajando el pH se van rompiendo los enlaces entre los grupos fosfato y el ion calcio al reducirse la ionización de los fosfatos. En segundo lugar, las repulsiones entre las micelas se reducen a medida que el pH se acerca al punto isoeléctrico de las caseínas. A un pH de alrededor de 4.5, y a una temperatura superior a 293.15 K, las caseínas se agregan, formando una cuajada poco mineralizada. En el tratamiento con quimosina, la caseína pierde por proteólisis de su región hidrofílica, dirigida hacia el exterior de las micelas. La reducción de la hidrofiliidad facilita la agregación. A temperaturas bajas, de refrigeración, los efectos hidrofóbicos que mantienen unidas a las moléculas de caseína se debilitan, e incluso una parte de la caseína sale de la micela. La gran mayoría permanece, pero unida menos fuertemente. En particular, las fuerzas que actúan sobre la región hidrofóbica de la caseína  $\beta$  se debilitan, haciendo que ésta exponga más hacia el exterior su región hidrofílica. Este hecho provoca un aumento de la hidratación y el volumen de la micela. Como consecuencia, a temperaturas de refrigeración no se produce la agregación de la caseína ni por la acción de la acidez ni por la de la quimosina.

### **6.1.3 Caseínas a alta presión: pasado, presente y futuro**

#### **6.1.3.1 Antecedentes en el caso de la leche**

El mayor cambio observable en la leche después de su tratamiento a alta presión es que se torna más translúcida. Este hecho se ha atribuido a la fragmentación micelar producida por la presión.<sup>69</sup> Los tratamientos a alta presión causan importantes modificaciones en las características de la micela de caseína que se han podido cuantificar posteriormente por técnicas basadas en la dispersión de luz como la turbidimetría o espectroscopía de correlación de fotones y microscopía electrónica. Según Desobry-Banon y col.<sup>70</sup> La distribución del tamaño micelar es función de la presión aplicada, pudiéndose observar diferentes comportamientos. Presiones de hasta 230 MPa no producen cambio de tamaño en las micelas, aunque algunos autores<sup>71</sup> han descrito un ligero incremento, de aproximadamente el 9 %, después de un tratamiento a 200 MPa. Para presiones entre 230 y 430 MPa se produce una

disminución del tamaño pasando de aproximadamente 180 - 190 nm hasta 130 nm, y por último, entre 430 y 700 MPa se ha observado una gran disminución en el tamaño de partícula (110 - 120 nm). Needs y col.<sup>72</sup> observaron mediante microscopía electrónica de transmisión que a presiones de 400 y 600 MPa, las micelas se encuentran totalmente disgregadas en pequeñas partículas. Esta fragmentación de las micelas conlleva un aumento progresivo, según la presión empleada, de la caseína soluble en el suero. Hay que destacar que, al igual que ocurre con las proteínas séricas, el efecto de los tratamientos a alta presión sobre el tamaño micelar depende de la temperatura. Gaucheron y col.<sup>73</sup> estudiaron el efecto combinado de la temperatura (4, 293.15 y 313.15 K) y los tratamientos a alta presión (250, 450 y 600 MPa durante 30 minutos) en las características físicoquímicas de la leche desnatada. Mientras que un tratamiento a alta presión de 450 MPa a 293.15 K no produjo cambios en el tamaño de las micelas, los tratamientos a 313.15 K produjeron un aumento en el tamaño micelar, y los tratamientos a 277.15 K produjeron una disminución. Sin embargo, a 450 y 600 MPa se produjo una disminución del diámetro medio de partícula, independientemente de la temperatura de tratamiento. Según Huppertz y col.<sup>74</sup> a bajas temperaturas podría haberse solubilizado parte del calcio coloidal, mientras que a temperaturas más elevadas el incremento del tamaño de las micelas podría deberse a interacciones, que serían análogas a las provocadas por los tratamientos térmicos entre las proteínas del suero desnaturalizadas y las caseínas.

Finalmente, además de la temperatura y la presión, la disociación de las caseínas por los tratamientos a alta presión se ve afectada también por el pH. En general, el nivel de caseína soluble aumenta en leches con pH ajustado a 5.5 ó 7.0 en relación con leche a pH 6.7.<sup>75</sup> Recientemente, han aparecido otros trabajos<sup>76,77,78,79</sup> en los que se ha estudiado la dinámica micelar de las caseínas utilizando técnicas de dispersión de luz in situ bajo presión. De esta manera se ha podido profundizar en el análisis de los resultados obtenidos por análisis post-tratamiento. Orliey y col.<sup>78</sup> han observado por turbidimetría en leche desnatada que las micelas de caseína se disocian cuando se aumenta la presión hasta alrededor de 150 MPa y que entre 250 y 300 MPa se reagregan. Entre 250 y 300 MPa, la reorganización de las micelas se produce con una cinética más lenta que a otras presiones. Esta cinética se ve acelerada aumentando la temperatura del tratamiento<sup>78</sup> de 278.15 a 313.15 K.

El pH juega un papel aún más importante que la temperatura sobre la estabilidad de las micelas de caseína bajo presión. Cuando se aumenta el pH de 5.5 a 7.5, la disminución inicial de turbidez asociada a la disociación micelar ocurre a presiones más altas: pasa de producirse a partir de 50 - 150 MPa a 350 - 400 MPa. El

pH modifica las interacciones electrostáticas y lleva a distintos niveles de fosfato de calcio ligado o no a la micela de caseína inicialmente. La presión modifica los efectos hidrofóbicos por lo que, dependiendo del estado inicial de la micela de caseína, el efecto observado depende del balance inicial entre los efectos hidrofóbicos (ligados a la temperatura) y las interacciones electrostáticas<sup>79</sup> (ligadas al pH). De todos los estudios realizados, se concluye que la disociación de las micelas de caseína bajo presión está fuertemente influida por factores fisicoquímicos. Para aprovechar las oportunidades de aplicación tecnológica que ofrece el efecto de la presión sobre las micelas de caseína, será necesario controlar esos factores.

El término equilibrio mineral de la leche hace referencia a la solubilidad y al estado de ionización de los minerales disueltos en ésta. El equilibrio mineral, principalmente de los cationes divalentes, calcio y magnesio, y del fosfato, se ve afectado por los cambios de composición que ocurren en la leche como consecuencia de los tratamientos tecnológicos. De esta forma, pequeñas alteraciones en el equilibrio mineral pueden ocasionar importantes efectos en la estabilidad micelar y en las propiedades de agregación, coagulación y estructura de la cuajada.

Hay que tener en cuenta que un mismo elemento se puede encontrar de muchas formas distintas en la leche, y que los tratamientos tecnológicos pueden afectar a una de las formas pero no a todas. Por ejemplo, el calcio en la leche se puede encontrar en forma de calcio coloidal, es decir, asociado directamente a las moléculas de caseína en ausencia o no del grupo fosfato; en forma de calcio soluble, que es el calcio presente en la fase soluble como el calcio iónico o acomplejado (principalmente por citrato o fosfato). Este calcio soluble representa aproximadamente el 33 % del calcio total en la leche de vaca; y por último en forma de calcio iónico ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que representa entre el 8 y el 10 % del calcio total.

Los tratamientos térmicos causan una disminución de la solubilidad del calcio y el magnesio y del fosfato soluble, que aumenta proporcionalmente con la intensidad del calentamiento.

Numerosos autores han sugerido que la disrupción de las micelas de caseína debida a los tratamientos a alta presión produce una redistribución de minerales y proteínas entre los estados soluble y coloidal. Esta desintegración micelar en pequeñas unidades ricas en caseína y calcio coloidal, aumentaría el calcio soluble y levemente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , mejorando las propiedades de coagulación de la leche.

Sin embargo, otros autores no han observado grandes diferencias en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  o de calcio y fosfato coloidales en las leches pasteurizadas,



por lo que sugirieron que el equilibrio mineral se regenera rápidamente una vez que la presión es liberada, promoviendo la formación de nuevas estructuras micelares. Esta reagrupación daría lugar a micelas de caseína con estructuras diferentes a las iniciales.

El tratamiento térmico disminuye el pH de la leche debido a la expulsión del  $\text{CO}_2$ , a ajustes en el equilibrio de los iones, a precipitaciones de fosfato de calcio y, cuando la temperatura supera los 363.15 K, a la degradación de la lactosa.

En lo que se refiere al tratamiento a alta presión en leche, se han observado distintos resultados dependiendo del tipo de leche. Así, en la leche desnatada no se aprecian cambios significativos en el pH o en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  tras un tratamiento a alta presión entre 200 y 600 MPa. En cambio, si se trata de leche desnatada esterilizada, el tratamiento a alta presión provoca un aumento de pH y se regeneran los niveles de calcio soluble que habían disminuido tras el tratamiento de esterilización (391.15 K, 15 minutos). El efecto combinado de la alta presión y la temperatura en leche desnatada induce una ligera solubilización del calcio y el fósforo coloidales con la presión, que no está relacionada con la solubilización de caseínas individuales.

En cuanto a la comparación del tratamiento a alta presión y térmico sobre las micelas de caseína en leche de cabra, el calentamiento entre 343.15 y 363.15 K provoca un ligero aumento de calcio coloidal. La alta presión no incrementa significativamente los niveles de calcio coloidal y fosfato inorgánico.

En lo referente al tratamiento a alta presión en leche de vaca, oveja y cabra se produce un aumento de la concentración de calcio, magnesio y fósforo solubles y pequeños incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  pero no se detectaron cambios de pH. Los cambios de concentración de minerales solubles fueron más notables en leche de oveja. Si se combinan tratamientos a alta presión y térmicos en leche de cabra, se produce un aumento de calcio, magnesio y fósforo soluble debidos a la alta presión, pero cambios inapreciables de pH o  $\text{Ca}^{2+}$ . Las temperaturas elevadas (358.15 K) disminuyen los minerales solubles.

Por último, la influencia del pH sobre los efectos de los tratamientos a alta presión produce pequeños incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  debidos al aumento de presión. La acidificación favorece la actividad del  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la alcalinización la perjudica.

En general, y como consecuencia de los tratamientos a alta presión, se produce un incremento de los minerales solubles. Sin embargo, este aumento no se traduce en un importante incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además se modifica el tamaño de las micelas de caseína y la desnaturalización de las proteínas del suero.

### 6.1.3.2 Antecedentes en el caso del caseinato

Las micelas de caseína se disocian en partículas más pequeñas denominadas submicelas debido al efecto de la presión por encima de 400 MPa.<sup>80,81,82,83</sup> Esta disociación debida a la presión se explica debido a lo débilmente que se encuentran unidas las submicelas, ya que son fuerzas de tipo hidrofóbico y la presión en este orden de magnitud, es capaz de actuar sobre ellas debido a la solubilización del fosfato cálcico coloidal fuera de la red micelar.<sup>84,85</sup> Se ha observado mediante espectroscopía de correlación de fotón (PCS) y microscopía de transmisión electrónica, que el tamaño de las micelas de caseína aumenta de 200 a 250 MPa<sup>86,87</sup> seguido de una disminución del tamaño de las micelas por encima de 400 MPa.<sup>88</sup>

En cuanto a la combinación de temperatura y presión se ha observado que un aumento de temperatura desde 277.15 a 313.15 K durante un tratamiento a alta presión, a 250 MPa, aumenta el tamaño de las micelas de caseína (252 nm a 313.15 K frente a 184 nm a 293.15 K o sólo 133 nm a 277.15 K).<sup>73</sup> En cambio, no se ha observado ninguna influencia de la temperatura por el tratamiento a presiones comprendidas entre 450 y 600 MPa. García Risco y col.<sup>89</sup> y Huppertz y col.<sup>87</sup> mostraron la presencia de grandes agregados de caseína en leche tratada a presiones comprendidas entre 250 y 400 MPa y temperaturas entre 313.15 y 333.15 K. Otros autores<sup>90</sup> sugieren que un aumento en la temperatura favorece las reacciones de agregación de las micelas de caseína, además de las interacciones hidrofóbicas, que también aumentan con la temperatura, pueden estar involucradas en la reasociación de micelas de caseína.

Las micelas de caseína forman geles. La gelificación de las caseínas ocurre debido a la desestabilización de las micelas de caseína, que puede ser inducida por diferentes procesos como un tratamiento térmico, un tratamiento a alta presión o durante el cuajado. Algunos autores observaron que la formación de geles se puede inducir mediante alta presión para una concentración de caseína en torno al 12 % a presiones de unos 600 MPa.

### 6.1.3.3 Investigaciones actuales

Paralelamente al desarrollo de esta tesis se han llevado a cabo estudios sobre la agregación de caseínas y el efecto de la presión sobre las mismas, así como otras variables como el pH o la temperatura. Estos trabajos se basan principalmente en el

uso de técnicas espectroscópicas como la dispersión de luz, la microscopía electrónica de transmisión o la dispersión de neutrones de ángulo ultrapequeño.

Así por ejemplo, se ha estudiado el efecto de la presión en la estructura de las micelas de caseína en leche mediante microscopía de transmisión electrónica. En este estudio se pone de relieve que la presurización de la leche a presiones moderadas, en torno a 150 – 300 MPa, favorece la formación de un gran número de pequeñas micelas que coexisten con una fracción de micelas de gran tamaño, y que se aprecian con una forma perfectamente esférica y de superficie lisa, lo cual se ha sugerido que se han formado a partir de una absorción secundaria de las caseínas. La presurización por encima de 400 MPa favorece la formación de agregados caseínicos de más pequeños, con tamaño comprendido entre 30 nm y 100 nm. Las medidas de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre muestran que el calcio se une nuevamente a las micelas de caseína después de la presurización de la leche. Además, mediante las imágenes de microscopía electrónica se observa que las subestructuras eran similares para las micelas de caseína tratadas a alta presión y las que no habían sido sometidas a alta presión.<sup>91</sup>

Los experimentos llevados a cabo por Geghardt y col.<sup>92</sup> mediante medidas in situ a alta presión de dispersión de luz y FTIR muestran que la presión induce una disociación irreversible de las micelas de caseína en monómeros por encima de un valor crítico dependiendo de su tamaño. Este valor de presión crítica aumenta con la temperatura, el pH y la concentración de calcio debido al balance entre las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Se ha comprobado cómo la turbidez de las disoluciones disminuye rápidamente con la presión, alcanzando el valor más bajo a 100 MPa. Este hecho es una evidencia clara de que la presión induce la disociación de los agregados de caseína. Este proceso es completamente reversible al cabo de unas pocas horas. También observan que las micelas de mayor tamaño son más susceptibles a la disociación por efecto de la presión que la gran cantidad de pequeñas partículas de caseína en disolución.

Respecto al estudio bajo presión ya no de caseínas sino de caseinato de sodio en los últimos años podemos decir que prácticamente los únicos experimentos que se han llevado a cabo han sido los de esta tesis. Este hecho pone de relieve que se trata de un tema de reciente investigación y que está en sus primeras etapas.

#### 6.1.3.4 Oportunidades de aplicaciones del tratamiento de caseínas a alta presión para la industria láctea

El potencial del tratamiento a alta presión en el caso de la leche radica en la modificación de las micelas de caseína de una forma no alcanzable mediante otros tratamientos físicos. Las propiedades tecnológicas de la leche se ven afectadas y dan lugar a efectos únicos para la fabricación de productos lácteos. A continuación se describen las posibles aplicaciones como consecuencia de la modificación de las micelas de caseína en interacción con las proteínas del suero.

- **Propiedades de coagulación con cuajo:** El tratamiento de la leche cruda a presiones de 100 a 300 MPa mejora las características de coagulación. El tiempo de coagulación decrece a medida que la presión se incrementa de 200 a 250 MPa, y vuelve a incrementarse a presiones mayores. El procesado a altas presiones y a bajas temperaturas, en torno a 276.15 K, contribuye también a que se produzca la coagulación más rápidamente.<sup>93</sup> Las altas presiones inducidas liberan caseína  $\kappa$  a la fase soluble ayudando a reducir la carga negativa y la repulsión electrostática.<sup>71,94</sup> La reducción del tamaño micelar también ha sido asociada con la producción de cuajadas más firmes. Los beneficios obtenidos en la reducción del tamaño micelar pueden ser contrarrestados en caso de producirse la desnaturalización de las proteínas del suero, por ejemplo si el tratamiento se lleva a cabo a temperaturas mayores de 313.15 K.<sup>94,95</sup>

- **Fabricación de queso con leche tratada a alta presión:** La desnaturalización de las proteínas del suero inducida por la presión aumenta el rendimiento quesero ya que se encuentra retenida en la cuajada. La presencia de  $\beta$ -lactoglobulina con las caseínas en la cuajada aumenta la carga neta efectiva y puede considerarse que mejora la solvatación<sup>96</sup> y reduce la sinéresis.<sup>97</sup> Las altas presiones pueden promover un aumento en el poder de solvatación debido a la disociación de las micelas en agregados más pequeños.<sup>73</sup> De hecho, la hidratación de micelas de caseína incrementó con tratamientos de 100 - 600 MPa.<sup>74</sup> Drake y col.<sup>98</sup> observaron que los quesos Cheddar hechos con leche tratada a alta presión presentaban mayor contenido de humedad que los quesos hechos a partir de leche cruda o pasteurizada, por lo que el rendimiento quesero fue mayor pero la textura obtuvo una valoración inferior a los quesos obtenidos a partir del tratamiento tradicional. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la sinéresis en cuajadas obtenidas con leche sin tratar o tratada a 200 y 400 MPa.<sup>71</sup> En otras condiciones de tratamiento (280 MPa, 282.15 K y 42 minutos) la capacidad de retención de agua fue menor y la cuajada mucho más firme.<sup>99</sup>

- **Coagulación ácida y fabricación de yogur:** La agregación de pequeñas partículas micelares daría como resultado agregados compactos de pequeño tamaño cuando se alcanza el punto isoeléctrico durante la fermentación con la  $\beta$ -lactoglobulina parcialmente desnaturalizada en la superficie de las micelas contribuyendo a la fuerza del gel y resistencia a la sinéresis.<sup>100,101</sup> Los tratamientos a alta presión de leche a 328.15 K proporcionan a los yogures una elevada firmeza sin ninguna perturbación micelar aparente, lo que pone de manifiesto la importancia de la contribución de la desnaturalización de las proteínas del suero. De la misma manera, el uso de tratamientos térmicos (358.15 K, 30 minutos) antes y después de un tratamiento a alta presión, asegura una amplia desnaturalización de las proteínas del suero mejorando las propiedades reológicas y reduciendo la sinéresis.<sup>100</sup> Sin embargo, ambos tipos de tratamiento permiten que las microestructuras del yogur sean similares a aquellas obtenidas usando únicamente leche tratada térmicamente, probablemente debido a que la disociación de micelas de caseína inducidas por el tratamiento de alta presión es, al menos parcialmente, contrarrestado por la reagregación que sucede en el almacenamiento de la leche previamente a ser tratada o después de ser tratada térmicamente.

- **Geles:** El tratamiento de alta presión de leche concentrada produce una gelificación. Una bajada del pH sobre 5.9 y un contenido de proteína elevado le dan mayor firmeza a los geles obtenidos con altas presiones.<sup>102</sup> Esto acentúa el papel de la disociación parcial de los minerales de la fase coloidal, así como esto también contribuye a la disociación de las micelas y al descenso de la repulsión electrostática a causa de la alta presión inducida. Se detectaron cambios en la viscosidad, viscoelasticidad y textura de los geles fabricados a partir de leche concentrada en función del nivel de presión al igual que en el caso del cuajo o geles ácidos. Cuando la liberación de la presión es lenta se permite el desarrollo de hiperestructuras que interfieren y se traducen en un gel homogéneo. El mantenimiento del nivel de presión es garantía para que se produzca la disociación de las micelas de caseína. Además de las aplicaciones mencionadas es importante también tener en cuenta que un porcentaje muy alto de nuevos productos de la industria alimentaria que emergen en el mercado son productos lácteos. La aplicación de la tecnología de las altas presiones permite obtener gelatinas y purés sin necesidad de añadir ni azúcares ni almidones. Sería necesario tener un mayor conocimiento sobre los efectos de las altas presiones hidrostáticas sobre los componentes de los alimentos y específicamente para el caso de los productos lácteos para su desarrollo tecnológico y su posterior aplicación en innovación y desarrollo de nuevos productos.

## 6.2 Metodología específica

En este apartado se comentará la metodología específica para el estudio de la agregación de las caseínas. Se analizará la composición química de las muestras, el procedimiento para la preparación de las disoluciones y las condiciones de los experimentos

### 6.2.1 Estudio de la composición química de la muestra de caseinato de sodio

Para los experimentos realizados se utilizó siempre caseinato de sodio de la misma muestra. El producto fue fabricado en Nueva Zelanda y es comercializado por la empresa Sigma-Aldrich (Ref. C8654, lote número 117K0138). Su contenido en proteínas y minerales fue analizado por la Unidad de Servicios y Técnicas Analíticas (USTA) del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN).

El contenido proteico obtenido mediante el método de Dumas sobre el método Kjeldahl con PTA/FQG-011, factor de conversión 6.38, fue de 91.5 %. La composición en sodio, calcio, potasio y magnesio obtenida por espectrometría de masas aparece en la Tabla 6.4. Estos valores son del mismo orden que los obtenidos por otros autores en cuanto al porcentaje de proteínas totales y al contenido en sodio. Para los demás minerales, la diferencia es mayor, probablemente en relación a la variabilidad de la materia prima y a una mayor purificación del caseinato de sodio utilizado en este trabajo. El contenido en agua, al igual que en el caso del dodecanoato de sodio, fue determinado mediante termogravimetría y fue de 6.2 % en base húmeda.

**Tabla 6.4.** Composición proteica y de minerales del caseinato de sodio utilizado en este trabajo de tesis y otros trabajos.

Proteínas Totales / % p/p	Minerales / mg·g <sup>-1</sup>				Agua / %	Referencia
	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>		
91.47	15.67	0.0284	0.045	0.025	6.18	Este trabajo
> 82		0.05			< 6	Moschakis <sup>103</sup>
86.09						Abascal <sup>104</sup>
90.4	14.0	0.9	0.1		5.1	Semenova
96	14.6	1.5	2.5	0.2	7.0	Mezdour <sup>105</sup>
		0.5			5.2	Povey <sup>60</sup>

Las muestras de leche utilizada fueron de la marca Puleva y Lauki en su variedad de leche desnatada homogeneizada pasteurizada. El análisis de los valores nutricionales en gramos medios por 100 mL especificados por el fabricante se muestra en la Tabla 6.5

**Tabla 6.5.** Composición nutricional de las muestras de leche desnatada pasteurizada.

<b>Muestra</b>	<b>Ca</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Glúcidos</b>	<b>Lípidos</b>
Puleva	110	3.1	4.7	0.3
Lauki	110	3.1	4.75	0.2

### 6.2.2 Preparación de las disoluciones

Las disoluciones se prepararon por pesada (balanza BBI-51, BOECO, Alemania) a la concentración deseada. La humedad relativa del caseinato de sodio se tuvo en cuenta a la hora de preparar las disoluciones. El caseinato de sodio se disolvió a temperatura ambiente por agitación moderada para evitar la introducción de aire en la muestra. El caseinato de sodio tardaba alrededor de 30 ó 40 minutos en disolverse, pero las disoluciones no se utilizaban hasta el día siguiente a su preparación, para permitir una mayor hidratación de las proteínas.

Para estudiar el efecto de la concentración, se preparó una disolución madre y a partir de ésta, el resto de disoluciones por dilución.

### 6.2.3 Condiciones de la experimentación

Para hacer el estudio del caseinato de sodio se han llevado a cabo varios tipos de medidas. En primer lugar se han medido la velocidad del sonido a presión atmosférica utilizando el equipo Anton Paar DSA 5000M descrito en el Capítulo 3 dedicado a materiales y métodos. También se han hecho medidas de velocidad del sonido a alta presión hasta 700 MPa y 298.15 K. Complementariamente, también se hicieron medidas de dispersión de luz con objeto de estudiar el tamaño promedio de los agregados de caseína y cómo afecta la presión al tamaño de estos agregados. Los experimentos de dispersión de luz consistieron en medir el tamaño de los agregados de una disolución de caseinato de sodio 2.6 % p/p así como su estabilidad con el

tiempo. La muestra fue nuevamente medida al cabo de 2 semanas. Por último, con objeto de estudiar el efecto de la presión sobre una disolución de caseinato de sodio al 2.6 % p/p, se sometió la muestra a 500 MPa y 298.15 K durante 20 minutos y se midió mediante dispersión de luz inmediatamente después. Estos resultados se muestran en el Apéndice V junto con una breve introducción de los fundamentos de la técnica.

## 6.3 Resultados

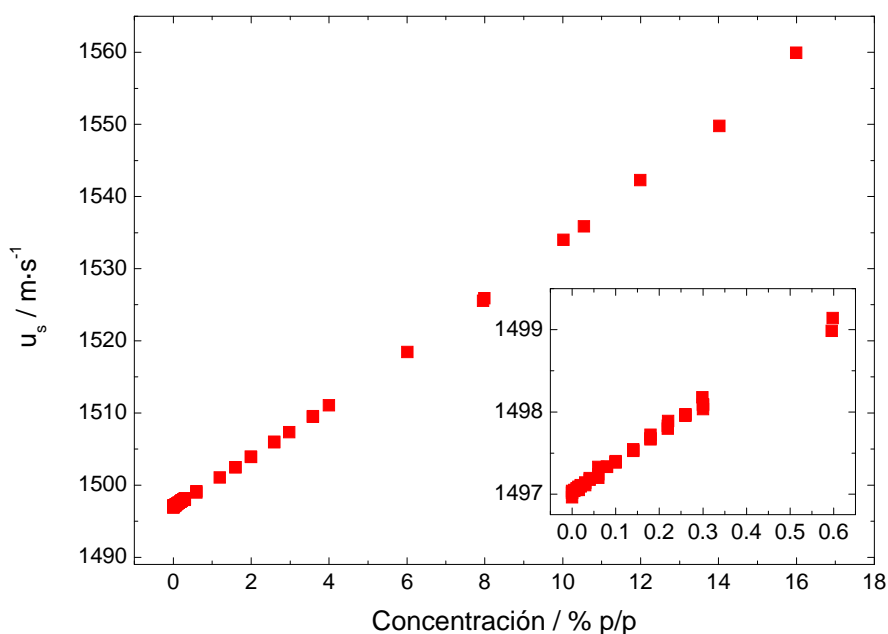
### 6.3.1 Estudio del caseinato de sodio a presión atmosférica

La estrategia a seguir para los experimentos a presión atmosférica consistió en medir la velocidad del sonido del caseinato de sodio en función de la concentración para caracterizar la agregación de las caseínas. La concentración de caseinato de sodio se varió hasta un máximo de 16 % p/p.

#### 6.3.1.1 Medidas de velocidad del sonido

- **Determinación de la CMC mediante medidas de velocidad del sonido**

Se llevaron a cabo medidas de velocidad del sonido utilizando el equipo Anton Paar DSA 5000M en un rango de concentración desde 0 a 16 % p/p con el objetivo de determinar la CMC. Los resultados se muestran en la Figura 6.15



**Figura 6.15.** Variación de la velocidad del sonido con la concentración de caseinato de sodio a 298.15 K. En la figura insertada se muestra un detalle ampliado de las concentraciones más bajas medidas.

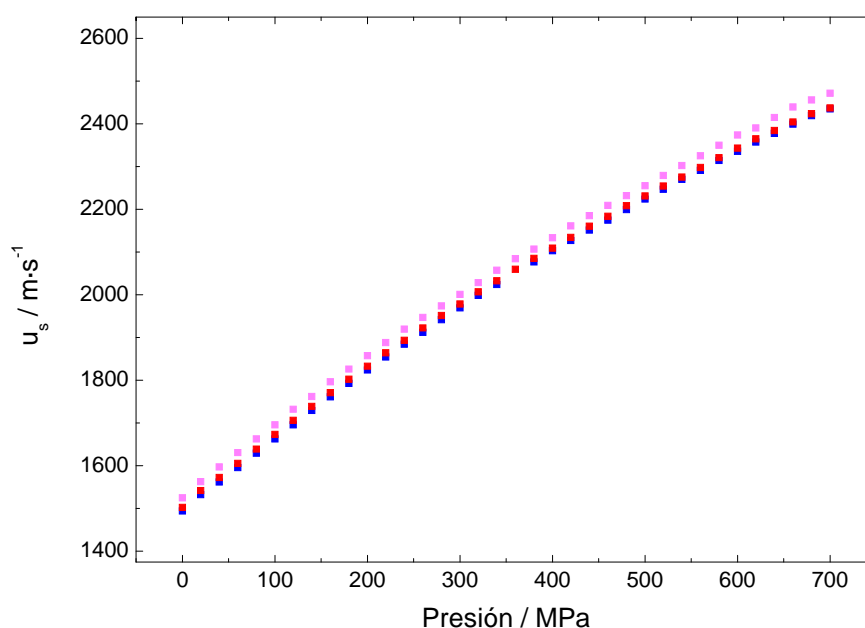


En la Figura 6.15 se observa que la velocidad del sonido aumenta de forma lineal con la concentración. La ausencia de curvatura o cambio de pendiente indican que no se está produciendo un fenómeno de agregación o bien, que éste no es detectable mediante medidas de velocidad del sonido. Estos resultados confirman los recogidos en la bibliografía: la formación de agregados de caseína es un proceso progresivo, alejado del comportamiento clásico observado en surfactantes como el NaL. Puesto que no todos los métodos de determinación de la CMC tienen la misma sensibilidad se realizaron medidas de densidad en función de la concentración para contrastar este hecho. Estos resultados se expondrán en el Capítulo 7.

### 6.3.2 Estudio de las caseínas a alta presión.

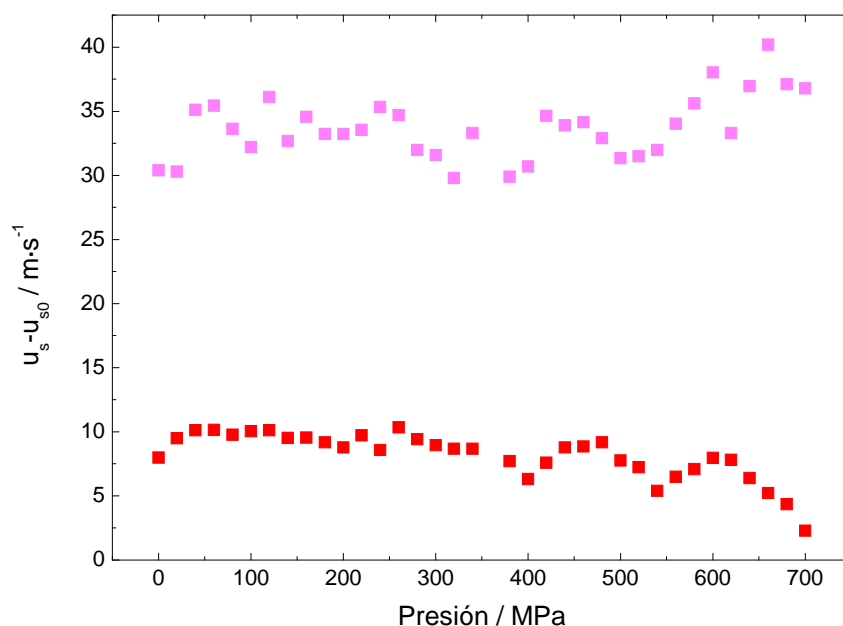
#### 6.3.2.1 Medidas de velocidad del sonido

Al igual que en el caso del NaL, se han realizado medidas de velocidad del sonido a alta presión hasta 700 MPa y 298.15 K para NaCas y leche desnatada pasterizada (LDP). La concentración de caseinato de sodio estudiada fue 2.6 % p/p. El valor de la desviación estándar para el NaCas está comprendido entre  $\pm 0.6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta presiones de unos 400 MPa y  $\pm 1.8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  para las más altas presiones. Por tanto, la barra de error es inferior al tamaño del punto. En comparación con la velocidad del sonido calculada en agua, ésta es más pequeña que en la disolución de caseinato de sodio entre 1 y  $13 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Como ya se ha visto en el Capítulo 5 dedicado al estudio del NaL, el sonido se transmite más rápidamente en sólidos que en líquidos, este hecho explica por qué la presencia de un soluto como el caseinato de sodio produce un aumento en la velocidad del sonido. Para el caso de la leche desnatada pasterizada (LDP) ocurre algo similar, existe una buena reproducibilidad entre los dos experimentos y la desviación estándar es de  $\pm 1.1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta presiones de unos 400 MPa y  $\pm 2.2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  a partir de 400 MPa y hasta 700 MPa. La barra de error para las velocidades del sonido vuelve a ser inferior al tamaño del punto. En la Figura 6.17 se muestran el valor medio para dichas medidas, así como para el disolvente puro.



**Figura 6.17.** Velocidad del sonido media en función de la presión para 3 disoluciones de (■) NaCas, (■) leche desnatada pasteurizada y (■) agua. La barra de error es del tamaño del punto.

Al igual que a presión atmosférica se puede hacer un análisis de la velocidad del sonido normalizada  $u_s - u_{s0}$ , donde  $u_s$  es la velocidad del sonido de la muestra y  $u_{s0}$  la velocidad del sonido del disolvente, de esta forma, restamos la contribución del agua a la muestra. Como se puede comprobar en la Figura 6.18, la mayor diferencia con respecto al agua corresponde a la leche desnatada pasteurizada puesto que es un medio más denso y con más moléculas en suspensión. La tendencia es similar para la LDP y para el NaCas, la diferencia se mantiene constante (líneas aproximadamente paralelas teniendo en cuenta el error experimental) a lo largo de todo el intervalo de presión estudiado.



**Figura 6.18.** Velocidad del sonido normalizada en función de la presión para 3 disoluciones de (■) NaCas, (■) leche desnatada pasteurizada a 298.15 K.

A continuación se hará un análisis de la información que se puede obtener a partir de la derivada del tiempo de vuelo frente a la presión, al igual que se ha hecho en los capítulos 4 y 5 para el agua y el NaL, respectivamente.

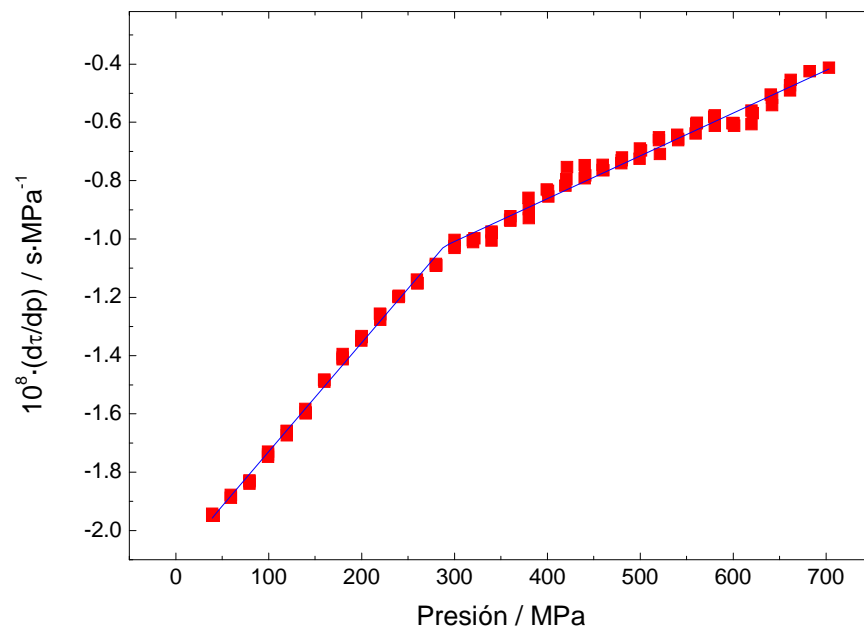
### 6.3.2.2 Ajustes de la derivada del tiempo de vuelo frente a la presión

Utilizando el algoritmo programado en OriginPro 8.0® descrito en el Capítulo 5 (Ecuación 5.1) se han llevado a cabo los ajustes tanto para el caseinato de sodio como para las caseínas en leche desnatada pasteurizada. El objetivo de estos ajustes es el mismo que se ha mostrado en los anteriores capítulos: observar si se produce o no un cambio de pendiente en la derivada del tiempo de vuelo con la presión. En caso afirmativo, nos indicaría que se está produciendo un cambio en el medio puesto que la tendencia no se mantiene constante.

- **Caseinato de sodio**

A continuación en la Figura 6.19 se representa el ajuste para la variación de la derivada del tiempo de vuelo,  $\tau$ , con la presión para tres muestras de caseinato de sodio. Para asegurar un buen ajuste es necesario eliminar algunos puntos a presiones bajas, dado que la alta sensibilidad del ajuste a pequeños cambios de pendiente produce resultados erróneos. A bajas presiones es posible que queden pequeñas

burbujas de aire que producen un cambio de pendiente, pero que no es debido a un cambio de agregación.

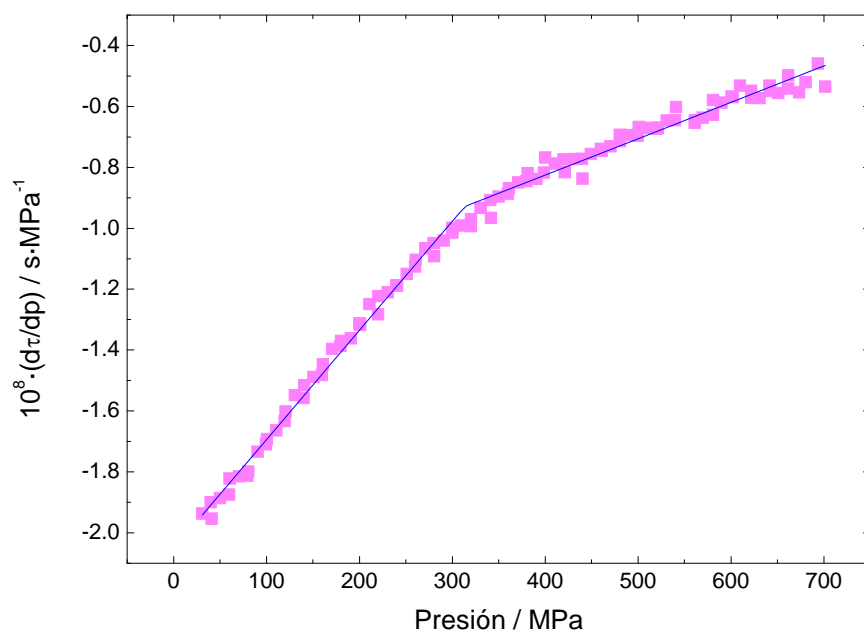


**Figura 6.19.** Ajuste de la variación de la derivada del tiempo de vuelo,  $\tau$ , con la presión para 3 muestras de caseinato de sodio a 298.15 K.

El valor de la presión de corte a la que se produce el cambio de pendiente es de  $(289 \pm 4)$  MPa.

- **Caseínas en leche desnatada pasteurizada**

El mismo análisis se puede hacer en el caso de las muestras de leche desnatada pasteurizada. En este caso se dispone de dos muestras y los experimentos se llevaron a cabo con incrementos de presión de 10 MPa y 20 MPa. La presión de corte que se obtiene con el ajuste a la que se produce el cambio de pendiente es de  $(313 \pm 5)$  MPa.



**Figura 6.20.** Ajuste de la variación del tiempo de vuelo,  $\tau$ , con la presión para dos muestras de leche desnatada pasterizada a 298.15 K.

A la vista de los resultados obtenidos para los ajustes tanto del caseinato de sodio (Figura 6.19) y leche desnatada pasterizada (Figura 6.20) podemos afirmar que la transición propuesta para el agua de baja densidad al agua de alta densidad (LDW→HDW) sigue teniendo lugar independientemente del soluto. Como se propuso en el Capítulo 4, esta transición para el agua a 298.15 K tiene lugar en el intervalo de presión entre 292.6 MPa y 306.4 MPa. Los valores obtenidos en este caso para el NaCas y la leche, 289 MPa y 313 MPa, respectivamente, se podría decir que están dentro del intervalo de error de la transición LDW→HDW.

## 6.4 Resumen y conclusiones

- Las medidas de velocidad del sonido frente a la concentración para el NaCas y LDP no muestran un cambio de pendiente. Este hecho indica un proceso de agregación progresivo y no instantáneo como en los surfactantes clásicos, es decir, que no se puede determinar una CMC para la agregación de caseínas como ocurría en el caso del NaL.
- Los resultados del análisis de dispersión de luz muestran que la disolución al 2.6 % p/p presenta una gran polidispersidad con un tamaño comprendido entre 150 y 350 nm.
- Las medidas de velocidad del sonido frente indican en la representación de su derivada con la presión un cambio de pendiente en torno a 300 MPa. Este

cambio de pendiente ocurre en el mismo intervalo de presión que la transición entre el LDW y HDW que hemos propuesto en el Capítulo 4. Al ser la agregación de caseínas un proceso progresivo ésta no se puede detectar mediante medidas de velocidad del sonido y lo que detectamos es la transición entre las dos estructuras del agua.

## 6.5 Referencias

- <sup>1</sup> Kiese S., Pappenberg A., Friess W., Mahler H. C.; *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 4347-4366.
- <sup>2</sup> Carpenter J. F., Kendrick B. S., Chang B.S., Manning M. C., Randolph T. W.; *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 236-255.
- <sup>3</sup> Karshikoff A.; *London: Imperial Collage Press.* **2006**, p 348.
- <sup>4</sup> Andya J. D., Hsu C. C., Shire S. J. A. A. P. S. *PharmSci.* **2003**, 5, E10.
- <sup>5</sup> Arakawa T., Timasheff S. N.; *Biophys. J.* **1985**, 47, 411-414.
- <sup>6</sup> Kendrick B. S., Cleland J. L., Lam X., Nguyen T., Randolph T. W., Manning M.C., Carpenter J. F.; *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 1069-1076.
- <sup>7</sup> Arakawa T., Bhat R., Timasheff S. N.; *Biochemistry.* **1990**, 29, 1914-1923.
- <sup>8</sup> Milton A. P.; *J. Pharm. Sci.* **2005**, 94, 1668-1675.
- <sup>9</sup> Rosenberg A. A. A. P. S. J. **2006**, 8, E501-E508.
- <sup>10</sup> Brange J., Havelund S., Hougaard P.; *Pharm. Res.* **1992**, 9, 727-734.
- <sup>11</sup> Kreigaard L., Jones L. S., Randolph T. W., Frokjaer S., Flink J. M., Manning M. C., Carpenter J. F.; *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 1597-1603.
- <sup>12</sup> Kuelzo L. A., Wang W., Randolph T. W., Carpenter J. F.; *J. Pharm. Sci.* **2007**, 97, 1801-1812.
- <sup>13</sup> Strambibi G. B., Gonnelli M.; *Biophys. J.* **2007**, 92, 2131-2138.
- <sup>14</sup> Pikal-Cleland K. A., Cleland J. L., Anchordoquy T. J., Carpenter J. F.; *J. Pharm. Sci.* **2002**, 91, 1969-1979.
- <sup>15</sup> Thomas C. R., Dunnill P.; *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, 21, 2279-2302.
- <sup>16</sup> Morel M-H., Redl A., Guilbert S.; *Biomacromolecules.* **2002**, 3, 488-497.

- <sup>17</sup> Gulseren I., Guzey D., Bruce B. D., Weiss J.; *Ultrason. Sonochem.* **2007**, 14, 173-183.
- <sup>18</sup> Chi E. Y., Krishnan S., Randolph T. W., Carpenter J. F.; *Pharm. Res.* **2003**, 20, 1325-1336.
- <sup>19</sup> Sharma B.; *Biotechnol. Adv.* **2007**, 25, 318-324.
- <sup>20</sup> Wang W.; *Int. J. Pharm.* **1995**, 185, 129-188.
- <sup>21</sup> Zhang W., Czupryn M. J., Boyle P. T., Amary J.; *J. Pharm. Res.* **2002**, 19, 1223-1231.
- <sup>22</sup> Bridgman P. W.; *J. Biol. Chem.* **1914**, 19, 617-630.
- <sup>23</sup> Mohana-Borges R., Silva J. L., Ruiz-Sanz J., de Prat-Gay G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, 96, 7888-7893.
- <sup>24</sup> Tan C.Y., Xu C. H., Wong J., Shen J. R., Sakuma S., Yamamoto Y., Lange R., Balny C., Ruan K. C.; *Biophys. J.* **2005**, 88, 1264-1275.
- <sup>25</sup> Smeller L.; *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, 1595, 11-29.
- <sup>26</sup> Drljaca A., Hubbard C. D., van Eldik R., Asano T., Basilevsky M. V., le Noble W.; *J. Chem Rev.* **1998**, 98, 2167-2289.
- <sup>27</sup> Zipp A., Kauzmann W.; *Biochemistry.* **1973**, 12, 4217-4228.
- <sup>28</sup> Privalov P. L.; *J. Chem. Thermodyn.* **1997**, 29, 447-474.
- <sup>29</sup> Randolph T. W., Seefeldt M., Carpenter J. F.; *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, 1595, 224-234.
- <sup>30</sup> Meersman F., Smeller L., Heremans K.; *High Press. Res.* **2000**, 19, 653-658.
- <sup>31</sup> Meersman F., Smeller L., Heremans K.; *Biophys J.* **2002**, 82, 2635-2644.
- <sup>32</sup> Seefeldt M. B., Rosendahl M. S., Cleland J. L., Hesterberg L. K.; *Curr. Pharmaceut. Biotech.*, **2009**, 10, 447-455.
- <sup>33</sup> Hummer G., Garde S., García A. E., Paulaitis M. E., Pratt L. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95, 1552-1555.
- <sup>34</sup> Collins M. D., Hummer G., Quillin M. L., Matthews B. W., Gruner S. M.; *Proc. Natl Acad. Sci USA.* **2005**, 102, 16668-16671.
- <sup>35</sup> Day R.; García A. E.; *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **2008**, 70, 1175-1184.
- <sup>36</sup> Seefeldt M. B., Crouch C., Kendrick B., Randolph T. W.; *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, 98, 476-485.
- <sup>37</sup> Crisman R. L., Randolph T. W.; *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, 107, 663-672.

- <sup>38</sup> Wallqvist A., Gallicchio E., Levy R. M.; *J. Phys. Chem. B.* **2001**, 105, 6745-6753.
- <sup>39</sup> Dadarlat V. M., Post C. B.; *Biophys. J.* **2006**, 91, 4544-4554.
- <sup>40</sup> Gekko K.; Hasegawa Y.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**, 25, 6563-6571.
- <sup>41</sup> Hamann S. D.; *Rev. Phys. Chem. Jpn.* **1980**, 50, 147-168.
- <sup>42</sup> Reinstadler D., Fabian H., Backmann J., Naumann D.; *Biochemistry.* **1996**, 35, 15822-15830.
- <sup>43</sup> Torrent J., Rubens P., Ribo M., Heremans K., Vilanova M.; *Protein Sci.* **2001**, 10, 725-734.
- <sup>44</sup> Chi E. Y., Krishnan S., Kendrick B. S., Chang B. S., Carpenter J. F., Randolph T. W.; *Protein Sci.* **2003**, 12, 903-913.
- <sup>45</sup> Ferrandini E., Castillo M., López M. B.; Laencina J.; *Anales de Veterinaria*, **2006**, 22, 5-18.
- <sup>46</sup> Swaisgood P. H.; *Food Chem.* **1996**, 841-879.
- <sup>47</sup> Dickinson E.; *J. Chem. Society-Faraday transactions*, **1992**, 88, 2973-2983.
- <sup>48</sup> Brule G.; Lenoir J. Eck. A.; *J. Dairy Research*, **1989**, 56, 403-409
- <sup>49</sup> Holt C.; *J. Dairy Sci.* **1998**, 80, 509-516.
- <sup>50</sup> Ruettimann K. W.; Ladisch M. R.; *Enzyme Microbiology Technology*, **1987**, 9, 578-598.
- <sup>51</sup> Rollema H. S.; *Adv. Dairy Chem.* **1992**, 1, 111-140.
- <sup>52</sup> Thompson M. P., Farrel H. M.; *Netherland Milk Dairy Journal*, **1973**, 27.
- <sup>53</sup> Hayakawa S., Nayai S.; *J. Dairy Sci.* **1985**, 76, 1850-1869.
- <sup>54</sup> Creamer L. K.; *Interactions of Food Proteins, American Chemistry Society Symposium*, **1991**, 149-163.
- <sup>55</sup> Farrell H. M., Kumosinski T. F., King G.; *J. Prot. Chem.*, **1994**, 13, 701-714.
- <sup>56</sup> Schimidt D. G., Buchheim W.; *Netherland milk and Dairy Journal*, **1976**, 30, 17-28.
- <sup>57</sup> Kalab M., Phibbs-Todd B. E., Allan-Wojtas P.; *Milchwissenschaft-Milk Sci. Int.*, **1982**, 37, 513-518.
- <sup>58</sup> Carroll R. J., Basch J. J., Phillips J. G., Farrell H. M.; *Food Microstructure.* **1985**, 4, 323-331.



- <sup>59</sup> Stothart P. H., Cebula D. J.; *J. Mol. Bio.* **1982**, 160, 391-395.
- <sup>60</sup> Povey M. J. W., Holding M., Higgs D., Wang Y.; *Int. Dairy J.* **1994**, 9, 299-303.
- <sup>61</sup> Holt C.; *Advances Protein Chemistry.* **1992**, 43, 63-151.
- <sup>62</sup> Horne D. S.; *Int. Dairy J.* **1998**, 8, 171-177.
- <sup>63</sup> Dalgleish D. G.; *Soft Matter*, **2011**, 7, 2265-2272.
- <sup>64</sup> Pitkowski A., Durand D., Nicolai T.; *J. Col. Int. Sci.* **2008**, 326, 96-102.
- <sup>65</sup> Chu B., Zhou Z., Wu G., Farrell H.M.; *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, 170, 102-108.
- <sup>66</sup> HadjSadok A., Pitkowski A., Benyahia L., Nicolai T., Moulai-Mostefa N.; *Food Hydrocolloids* **2008**, 22, 1460-1466.
- <sup>67</sup> Panouillé M., Benyahia L., Durand D., Nicolai T., *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**, 287, 468-476.
- <sup>68</sup> Luquet, F. M.; *Leche y Productos Lácteos*. Editorial Acribia,S.A., Zaragoza. **1993**, 278-317.
- <sup>69</sup> Payens T. A., Heremans K.; *Biopolymers-Peptide Science Section.* **1969**, 8, 335-345.
- <sup>70</sup> Desobry-Banon S., Vétier, N., Ould Eleya M. M., Hardy J.; *J. Dairy Science.* **1994**, 80, 3161-3166.
- <sup>71</sup> Needs E. C., Stenning R. A., Gill A. L., Ferragut V., Rich G. T.; *J. of Daity Research.* **2000**, 67, 31-42.
- <sup>72</sup> Needs E. C., Capellas M., Bland A. P., Manoj P., Macdougall D., Paul G.; *J. of Dairy Research.* **2000**, 67, 329-348.
- <sup>73</sup> Gaucheron F., Famelart M. H., Mariette F., Raulot K., Michel F., Le Graet Y.; *Food Chemistry.* **1997**, 59, 439-447.
- <sup>74</sup> Huppertz H., Von der Eltz B.; *Journal of the American Chemical Society.* **2002**, 124, 9376-9377.
- <sup>75</sup> Arias M., Lopez-Fandino R., Olano A.; *Milchwissenschaft.* **2000**, 55, 191-194.
- <sup>76</sup> Gebhardt R., Doster W., Friedrich J., Kulozik U.; *European Biophysics Journal.* **2006**, 35, 503-509.
- <sup>77</sup> Huppertz T., De Kruif C.G., Kelly A.L.; *Journal of Dairy Research.* **2006**, 73, 294-298.
- <sup>78</sup> Orlén V., Knudsen J.C., Colon M., Skibsted L.H.; *Food Chemistry.* **2006**, 98, 513-521.
- <sup>79</sup> Orlén V., Boserup L., Olsen K.; *Journal of Dairy Science.* **2010**, 93, 12-18.

- <sup>80</sup> Schmidt D.G., Buchheim, W.; *Milk Science International* **1970**, 25, 596-599.
- <sup>81</sup> Schrader K., Buchheim W.; *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, **1998**, 50, 79-88.
- <sup>82</sup> Needs E.C., Stenning R.A., Gill A.L., Ferragut, V., Rich G.T. *J. Dairy Research*, **2000**, 67, 31-42.
- <sup>83</sup> Regnault S., Thiebaud M., Dumay E., Cheftel J.C.; *Int. Dairy Journal*, **2004**, 14, 55-68.
- <sup>84</sup> Mozhaev V.V., Heremans K., Frank J., Masson P., Balny C.; *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **1996**, 24, 81-91.
- <sup>85</sup> Schrader K., Buchheim W., Morr C.V.; *Nahrung*, **1997**, 41, 133-138.
- <sup>86</sup> Gaucheron F., Famelart M.H., Mariette F., Raulot K., Michel F., Le Graet Y.; *Food Chemistry*, **1997**, 59, 439-447.
- <sup>87</sup> Huppertz T., Fox P.F., Kelly A.L.; *J. Dairy Research*, **2004**, 71, 97-106.
- <sup>88</sup> Desobry-Banon S., Richard F., Hardy J.; *J. Dairy Science*, **1994**, 77, 3267-3274.
- <sup>89</sup> García-Risco M.R., Olano A., Ramos M.; López-Fandiño R.; *J. Dairy Science*, **2000**, 83, 2184-2189.
- <sup>90</sup> Anema S. G., Lowe E. K., Stockmann R.; *Food Hydrocolloids*, **2005**, 19, 257-267.
- <sup>91</sup> Knudsen J. C., Skibsted L. H.; *Food Chemistry*, **2010**, 119, 202-208.
- <sup>92</sup> Gebbhardt R., Takeda N., Kulozik U., Doster W.; *J. Phys. Chem. B.*, **2011**, 115, 2349-2359.
- <sup>93</sup> Pandley P. K., Ramaswamy H. S., St-Gelais D.; *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **2003**, 4, 245-256.
- <sup>94</sup> López-Fandiño R., de la Fuente M. A., Ramos M., Olano A.; *J. Dairy Research*. **1998**, 65, 69-78.
- <sup>95</sup> Zobrist M. R., Huppertz T., Uniacke T., Fox P. F., Kelly A. L.; *Int. Dairy Journal*. **2005**, 15, 655-662.
- <sup>96</sup> Imafidon G. I., Farkye N. Y.; *J. Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44, 2560-2562.
- <sup>97</sup> Smith M., Mc Mahon D. J.; *J. Dairy Sci.* **1996**, 79, 15213-1520.
- <sup>98</sup> Drake M. A., Harrison S. L., Asplund M., Barbosa-Canovas G., Swanson B. G.; *Journal of Food Science*. **1997**, 62, 843-860.

- <sup>99</sup> Pandey P. K., Ramaswamy H. S., St-Gelais D.; *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **2003**, 4, 245-256.
- <sup>100</sup> Harte F., Luedecke L., Swanson B., Barbosa-Cánovas G. V.; *Journal of Dairy Science*. **2003**, 86, 1074-1082.
- <sup>101</sup> Johnson D. E., Murphy R. J., Rutherford J. A., McCreedy R. W.; *Milchwissenschaft*. **2002**, 57, 605-608.
- <sup>102</sup> Famelart M. H., Chamron L., Piot M., Brulé G., Durier C.; *Journal of Food Engineering*. **1998**, 36, 149-164.
- <sup>103</sup> Moschakis M., Murray B. S., Dickinson E.; *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 345, 278-285.
- <sup>104</sup> Abascal D. M., Fadrike J. G.; *Food Hidrocolloids*. 2009, 23, 1848-1852.
- <sup>105</sup> Mezdour S., Boyaval P., Korolczuk J.; *Dairy Sci. Techol.*, **2008**, 88, 313-325.

## ***CAPÍTULO 7***

# ***ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN AGUA- AGREGADO MEDIANTE PROPIEDADES VOLUMÉTRICAS APARENTES***

---

### **7.1 Introducción**

En el Capítulo 4 hemos puesto en evidencia el paso a una organización estructural más compacta de las moléculas de agua líquida al aumentar la presión. En los capítulos 5 y 6 caracterizamos la agregación de dos sistemas: el NaL en agua bajo presión y las caseínas a 298.15 K. A partir de ello pudimos remarcar que las presiones en las que ocurren cambios tanto en el agua como en el estado de agregación del NaL y de las caseínas se corresponden. Esto nos lleva ahora a mirar con más detalle cómo es la interacción del agua con los sistemas estudiados.

Proponemos hacer un estudio de los cambios de hidratación sufridos por estas sustancias con capacidad para agregarse y formar estructuras supramoleculares mediante el análisis de sus propiedades volumétricas aparentes. Gracias al análisis de estas propiedades seremos capaces de explicar la interacción entre las moléculas y el agua, completando así el estudio de la agregación de estas sustancias.

### 7.1.1 Las propiedades aparentes

El estudio de las propiedades aparentes en los sistemas micelares proporciona gran cantidad de información para comprender los fenómenos de agregación. Además, en esta tesis se estudiarán estas propiedades en función de la concentración, temperatura o presión, para ver cómo afectan a estas propiedades.

Una gran parte de esta tesis está dedicada al estudio de propiedades aparentes en el NaL y el NaCas. Por tanto, resulta interesante comentar inicialmente las expresiones utilizadas para determinarlas.

#### 7.1.1.1 Volumen aparente

El volumen aparente  $V_\phi$  representa el volumen correspondiente al soluto en disolución. Se deduce de la Ecuación 7.1:

$$V_{disolución} = w_{disolvente} V_{disolvente} + w_{soluta} V_\phi \quad \text{Ecuación 7.1}$$

donde  $V_{disolución}$  es el volumen de la disolución,  $V_{disolvente}$  es el volumen del disolvente, y  $w_{disolvente}$  y  $w_{soluta}$  representan las fracciones de concentración del disolvente y del soluto, respectivamente. Se resta el volumen del agua al volumen de la disolución y queda sólo el correspondiente al soluto incluyendo la contribución de su interacción con el agua. Ordenando los términos y sustituyendo  $w = w_{soluta} = 1 - w_{disolvente}$ , se obtiene la Ecuación 7.2:

$$V_\phi = \frac{1}{w} (v_{disolución} - v_{disolvente}) + v_{disolvente} \quad \text{Ecuación 7.2}$$

Dependiendo de si el volumen y la concentración se expresan por unidades de masa o de mol, se habla de volumen específico aparente o de volumen molar (o molal) aparente, respectivamente. Los volúmenes de la disolución y del disolvente se determinan a partir de las densidades medidas en unas mismas condiciones, sea a presión atmosférica o a alta presión y a una temperatura dada.

En el caso del NaL, se ha trabajado en unidades de molalidad, al ser esa la unidad habitualmente empleada en otros trabajos, por lo que la expresión utilizada ha sido la siguiente:

$$V_\phi = \frac{M}{\rho} - \frac{(\rho - \rho_0)}{m\rho\rho_0} \cdot 10^3 \quad \text{Ecuación 7.3}$$

donde  $M$  es la masa molar del soluto, que al ser una sustancia relativamente pura y de menor tamaño que el NaCas, se conoce con precisión cuál es su valor;  $\rho$  y  $\rho_0$  son las densidades de la disolución y del disolvente, respectivamente, y  $m$  la molalidad de la disolución.

En el caso del NaCas, al tratarse de un conjunto de proteínas con sodio y otros compuestos minoritarios (ej. calcio, potasio, magnesio), la masa molecular exacta no está definida. Se espera que esté entre 19000 y 25000 g·mol<sup>-1</sup> de acuerdo a las masas moleculares extremas de los cuatro tipos de caseínas que constituyen el soluto. Por lo tanto, resulta más conveniente expresar la fracción de concentración en términos de masa por lo que se obtiene el volumen específico aparente con la Ecuación 7.2 en donde  $w$  representa la fracción másica de soluto, y los volúmenes de disolución y disolvente se sustituyen por los inversos de las densidades medidas.

A dilución infinita, el volumen molar aparente se iguala con el volumen molar parcial del soluto. Por ello, si se trata de medidas en disoluciones muy diluidas (caso de los surfactantes) o si la dependencia del volumen aparente con la concentración es muy débil (caso de las proteínas), a veces, se habla indistintamente del uno o del otro asimilando ambos bajo el símbolo  $v_\phi$ .

### 7.1.1.2 Compresibilidad adiabática aparente

La compresibilidad adiabática aparente,  $\kappa_{s\phi}$ , representa la compresibilidad adiabática del soluto en disolución. De forma análoga al volumen específico aparente, se debe tener en cuenta las propiedades del disolvente y de la disolución:

$$\kappa_{s\phi} = \frac{1}{w} \left( \kappa_{s \text{ disolución}} V_{\text{disolución}} - \kappa_{s \text{ disolvente}} V_{\text{disolvente}} \right) + \kappa_{s \text{ disolvente}} V_{\text{disolvente}} \quad \text{Ecuación 7.4}$$

Teniendo en cuenta que la compresibilidad adiabática,  $\kappa_s$ , depende del volumen específico y de la velocidad del sonido (ecuación de Newton-Laplace):

$$\kappa_s = -\frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial P} \right)_s = \frac{1}{\rho u_s^2} \quad \text{Ecuación 7.5}$$

Se puede obtener que  $\kappa_{s\phi}$  es igual a:

$$\kappa_{s\phi} = \frac{1}{w} \left( \frac{V_{\text{disolución}}^2}{u_{s \text{ disolución}}^2} - \frac{V_{\text{disolvente}}^2}{u_{s \text{ disolvente}}^2} \right) + \frac{V_{\text{disolvente}}^2}{u_{s \text{ disolvente}}^2} \quad \text{Ecuación 7.6}$$

En el caso del NaL, la expresión utilizada para el cálculo de la compresibilidad molar adiabática aparente es la siguiente:

$$\kappa_{s\phi} = \frac{10^3(\kappa_s - \kappa_{s0})}{m\rho_0} + \kappa_{s0}V_\phi \quad \text{Ecuación 7.7}$$

donde  $\kappa_s$  y  $\kappa_{s0}$  son las compresibilidades adiabáticas de la disolución y del disolvente, respectivamente, determinadas a partir de los datos experimentales.

## 7.1.2 Aplicaciones de las propiedades aparentes

### 7.1.2.1. Caracterización de las condiciones de agregación de compuestos anfifílicos de uso detergente, farmacéutico, textil o cosmético

El estudio de las propiedades volumétricas aparentes de compuestos anfifílicos permite caracterizar los cambios de hidratación que suceden cuando éstos forman agregados. En efecto, las propiedades volumétricas aparentes incluyen el volumen del soluto en sí y del cambio de volumen del solvente al formar una capa alrededor del soluto. Al determinar las propiedades aparentes en función de la concentración, es posible conocer el volumen molar parcial del soluto cuando se encuentra en el estado de monómero dispersado,  $V_\phi^s$ , y cuando se encuentra en el estado micelar,  $V_\phi^m$ . La variación del volumen molar parcial,  $\Delta V_\phi = V_\phi^m - V_\phi^s$ , entre ambos estados es característica de la agregación del compuesto bajo estudio. Gracias a ello, Huang y Verall<sup>1</sup> han concluido que las micelas de carboxylatos de sodio tienen desde una estructura suelta con un número de agregación de 10 a 15 para el octanoato de sodio hasta una estructura micelar regular y bien definida con un número de agregación de 60 para el NaL. De manera similar, Attwood y col.<sup>2</sup> sacaron información sobre la estructura de agregados de compuestos de naturaleza anfifílica utilizados como medicamentos neurolépticos. Dedujeron en el caso de antipsicóticos (phenothiazinas) y antidepresivos (imipramina) que los agregados formados son más compactos que las típicas micelas de surfactante. En lo que se refiere a compuestos poliméricos, las propiedades aparentes ponen de relieve las interacciones entre los monómeros y pequeños agregados poliméricos con estructura micelar, o incluso, posibilita la determinación de las condiciones de temperatura y concentración a las cuales se produce la autoagregación. El estudio de la compresibilidad adiabática aparente permite evaluar el balance entre las regiones hidrofílicas e hidrofóbicas del polímero. Postulando modelos en base al comportamiento que siguen ciertos polímeros, se ha podido mostrar que en el núcleo de los agregados poliméricos existe agua. Por tanto, vemos cómo el estudio de estas propiedades nos informa acerca de la interacción agua - polímero. Como ilustración de ello, citemos aquí los trabajos de Wen y Verall,<sup>3</sup> y de

Sommer y col.<sup>4</sup> sobre copolímeros dibloque y tribloque conteniendo poli(óxido de etileno), poli(óxido de butileno) y/o poli(óxido de propileno), polímeros empleados en la industria textil, cosmética, y química.

#### 7.1.2.2 Mecanismos de plegamiento y de desnaturalización de proteínas en medio acuoso

Las propiedades aparentes se pueden utilizar para hacer caracterizaciones estructurales y termodinámicas de las interacciones intra e intermoleculares que estabilizan o desestabilizan sistemas formados por proteínas en los que éstas se desnaturalizan o se agregan. Las medidas de propiedades volumétricas resultan muy útiles para este fin, y en muchos casos, constituyen la única fuente de información acerca de la hidratación de las proteínas, es decir, de la interacción agua - proteína. Las interacciones entre el disolvente y los grupos atómicos de las proteínas en contacto con éste provocan que el comportamiento termodinámico sea diferente al del disolvente puro. Efectivamente, el agua de hidratación de una proteína es diferente respecto al agua como disolvente puro y está relacionado con el valor que toma su volumen molar parcial o su compresibilidad. Por tanto, se puede distinguir entre las poblaciones de moléculas de agua que son del disolvente puro y las que están formando agua de hidratación de la proteína y están unidas directamente a ellas. El agua de hidratación de una proteína así como el empaquetamiento de sus átomos cambian durante el plegamiento, los cambios de conformación o la agregación con otras proteínas. Por tanto, las medidas volumétricas sirven para identificar y cuantificar cambios en la hidratación de la superficie de las proteínas con respecto al interior de la proteína,<sup>5</sup> y en el empaquetamiento en relación con cambios conformacionales o la agregación con otras moléculas. Permiten caracterizar la estabilidad de proteínas e investigar su dinámica conformacional. Un modelo útil para interpretar las variaciones en las propiedades volumétricas de las proteínas debidas a fenómenos de desnaturalización o de agregación/disociación es el propuesto inicialmente por Kauzman y que consiste en descomponer el volumen aparente en varias contribuciones.<sup>6,7,8</sup> Se propone, por ejemplo, la siguiente descomposición:

$$V_{\phi} = V_{\text{átomos}} + V_{\text{cavidades}} + V_{\text{interacción}} \quad \text{Ecuación 7.9}$$



donde  $V_{\text{átomos}}$  es el volumen correspondiente a la suma de los volúmenes de los átomos que constituyen la proteína,  $V_{\text{cavidades}}$  es el volumen de los huecos debidos al empaquetamiento imperfecto de los átomos y  $V_{\text{interacción}}$  es el volumen correspondiente a la interacción proteína-solvente, principalmente el volumen de hidratación. A pesar del avance en los últimos años en este campo, es necesario profundizar estas investigaciones para llegar a entender todo el potencial de las medidas volumétricas. Esto es de interés, en particular, para definir cómo es el empaquetamiento intraglobular y la influencia de las interacciones soluto - disolvente en la termodinámica del proceso de plegamiento y de agregación.

### 7.1.2.3 Índice de sabor

El volumen específico aparente se ha relacionado con el sabor.<sup>9</sup> En efecto, para acceder al sitio receptor de la lengua a través de la saliva, la molécula estímulo del gusto debe tener el volumen molecular óptimo y la forma apropiada. Se ha desarrollado una escala que distingue entre las principales modalidades de sabor: dulce, salado, ácido y amargo. Así, se ha comprobado que los compuestos que tengan un volumen específico aparente entre 0.5 y 0.7 cm<sup>3</sup>·g<sup>-1</sup> suelen tener un sabor dulce (los azúcares tienen un  $V_{\phi}$  en el medio de este rango). Valores más altos del volumen específico aparente se asocian al sabor amargo mientras que valores menores corresponden a sabores ácido o salado. La compresibilidad adiabática aparente informa de la movilidad del soluto en la saliva al reflejar el carácter más o menos compacto de la capa de hidratación alrededor del soluto. El estudio de las propiedades aparentes, además de proporcionarnos información sobre la interacción agua - soluto en fenómenos de agregación, es, entonces, también de interés para otros aspectos de la ciencia de los alimentos.

## 7.1.3 Efecto de factores sobre las propiedades aparentes

### 7.1.3.1 Efecto de la temperatura sobre las propiedades aparentes en disoluciones acuosas de surfactantes y de proteínas

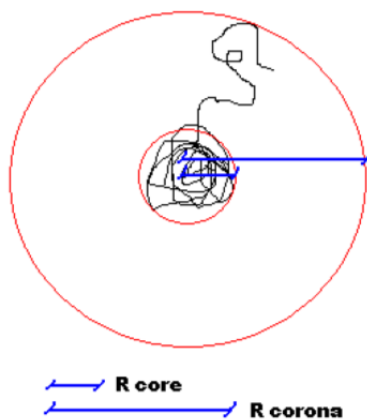
El volumen molar parcial del decanoato de sodio (NaC<sub>10</sub>) en disoluciones es una propiedad que se ha medido en función de la temperatura para diferentes concentraciones. Según si se encuentra en el estado de monómero dispersado o en el estado micelar, el volumen molar parcial del soluto es respectivamente  $V_{\phi}^s$  o  $V_{\phi}^m$ . Se

observa que la variación del volumen molar parcial,  $\Delta V_\phi = V_\phi^m - V_\phi^s$ , asociado al paso al estado micelar,<sup>10</sup> disminuye al aumentar la temperatura, y este decrecimiento sigue una tendencia lineal en el intervalo de temperatura de 293.15 a 313.15 K. En el caso de los alquilsulfatos<sup>11</sup> o los NTABr<sup>12</sup> se han encontrado resultados similares.

En cuanto a la temperatura para el caso del sistema de estudio NaL en esta tesis, se sabe que  $V_\phi^s$  aumenta con la temperatura, pero este incremento es menor a temperaturas altas. Este resultado se reproduce en el caso del NTABr, o para otras series de alcanos, como el heptanoato por debajo de la CMC.<sup>13</sup> El hecho de que  $V_\phi^m$  muestre un aumento con la temperatura se puede explicar debido al aumento de la energía cinética de las moléculas de surfactante en el interior de las micelas, aumentando, por tanto, el espacio libre entre las moléculas. El volumen de los grupos iónicos de las cabezas polares de la superficie de las micelas, también aumenta con la temperatura.

El efecto de la temperatura sobre las propiedades volumétricas de las proteínas fue abordado inicialmente por Gekko y col.<sup>14</sup> Mediante medidas de velocidad del sonido, determinaron que la compresibilidad adiabática aparente del lisosoma y de la albumina bovina del suero adoptaba valores negativos al bajar la temperatura de 313 a 283 K. En lo que se refiere al efecto de la temperatura sobre el volumen aparente de las caseínas, no constan estudios. En cambio, se ha estudiado cómo la temperatura influye sobre la agregación de las caseínas en medio acuoso. Esto nos permite sentar las bases para postular como variarían las propiedades aparentes de las caseínas con la temperatura. Así por ejemplo, Hustinx y col.<sup>15</sup> comprobaron que a pH 6.7, el pH normal que tienen el NaCas, se puede calentar a 413.15 K durante 40 minutos antes de que coagule. Los cambios que se producen afectan probablemente a la funcionalidad de la proteína.<sup>16</sup> Debido al calentamiento se puede producir desfosforilación y división de cadenas peptídicas.<sup>17</sup> Guo y col.<sup>18</sup> afirmaron que la agregación aumenta cuando se eleva la temperatura de calentamiento hasta los 413.15 K. La turbidez en la disolución aumenta rápidamente de 403.15 K a 413.15 K y se produce un descenso de la misma cuando éstas se someten a temperaturas mayores de 418.15 K, lo que indica que probablemente se produce la degradación de las caseínas. También comprobaron que las caseínas  $\kappa$  y  $\alpha_{s2}$  eran más susceptibles a las altas temperaturas que las caseínas  $\beta$  y  $\alpha_{s1}$ . Pitkowski y col.<sup>19</sup> se interesaron por la variación del peso molecular promedio (relacionado con el número de agregación) y del radio hidrodinámico de las partículas de NaCas a medida que se incrementaba la temperatura desde 283.15 K hasta 323.15 K. Observaron que el número de agregación al menos se duplicaba en ese

intervalo y que el radio hidrodinámico pasó de 11.5 a 13.2 nm. Aschi y col.<sup>20</sup> también estudiaron la influencia de la temperatura. Para disoluciones de caseína  $\beta$  analizaron dos parámetros: el  $R_{\text{core}}$  y  $R_{\text{corona}}$ , que se refieren al radio del núcleo y el radio de lo que no pertenece al núcleo. En la Figura 7.1 se representa un esquema de estos dos parámetros.



**Figura 7.1.** Representación de los parámetro  $R_{\text{core}}$  y  $R_{\text{corona}}$ .

En su investigación Aschi y col. afirmaron que  $R_{\text{core}}$  y  $R_{\text{corona}}$  aumentan al aumentar la temperatura.

Además del descenso de la hidratación de las partículas, el volumen ocupado por los huecos aumenta debido al ensamblaje imperfecto de las moléculas y al aumento de la hidrofobicidad de las mismas que hace que el agua que estaba unida a ellas se vaya a la fase libre. Este aumento del volumen de huecos contribuiría positivamente al valor de  $\kappa_{s\phi}$ . También la agitación térmica es mayor cuanto mayor sea la temperatura, por lo que el volumen relacionado con ella contribuiría positivamente al aumento global observado.

### 7.1.3.2 Efecto de la presión sobre las propiedades aparentes en disoluciones acuosas de surfactantes y de proteínas

En el caso de la presión, ésta es capaz de afectar a las interacciones intramoleculares en disoluciones micelares y proteicas, por lo que las propiedades volumétricas aparentes se verán modificadas. Apenas existen datos experimentales sobre cómo varían las propiedades volumétricas aparentes con la presión. La falta de aparatos que permitan su determinación con suficiente precisión en alta presión es la principal razón de este desconocimiento. Los resultados publicados provienen en su mayoría de la aplicación de la técnica del tubo vibrante para la densidad a presiones

por debajo de 100 MPa. La medida con ultrasonidos también fue empleada, alcanzando presiones del orden de 200 MPa.

A partir de medidas directas de volumen y de compresibilidad de disoluciones de tensioactivos aniónicos en función de la presión y de la temperatura, se ha podido concluir que el volumen molar aparente de los iones monoméricos aumenta con la presión, mientras que dicha magnitud en las micelas disminuye al comprimir el sistema. Por lo tanto, la diferencia entre ambos, el cambio en el volumen molar por la formación de las micelas,  $\Delta V^m$ , es positiva a presión atmosférica y disminuye al aumentar la presión, haciéndose cero, en general, en un intervalo de presiones alrededor de 100 - 140 MPa y, a presiones más altas,  $\Delta V^m$  alcanza valores negativos. La relación entre la dependencia con la temperatura de  $\Delta V_\phi$  y la dependencia con la presión de la entropía de micelización,  $\Delta S^m$ , viene dada por la expresión:

$$\left( \frac{\partial \Delta V^m}{\partial T} \right)_m = - \left( \frac{\partial \Delta S^m}{\partial P} \right)_T \quad \text{Ecuación 7.8}$$

Los resultados obtenidos implican que la variación de entropía en la formación de las micelas aumenta con la presión, al menos a bajas presiones.

Las investigaciones de Fahey y col.<sup>21</sup>, de Seeman y col.<sup>22</sup> así como de Gekko y col.<sup>23</sup> son las únicas que se han llevado a cabo sobre las propiedades volumétricas de las proteínas bajo presión. En el primer estudio, no se observan cambios significativos en el volumen específico aparente de las proteínas estudiadas (ribonucleasa, proteínas del virus del mosaico del nabo y del tabaco, proteínas del cápside) hasta 40 MPa. En el segundo, se muestra cómo la desnaturalización de la nucleasa estafilocócica inducida por la presión es acompañada de una disminución (a baja temperatura) o de un aumento (a alta temperatura) marcada de su volumen específico en la tendencia con la presión hasta 100 MPa. En el último, se obtiene el volumen específico de la albumina bovina del suero hasta 78 MPa; de su dependencia con la presión, se deduce la compresibilidad isoterma a presión atmosférica a temperaturas entre 278 y 308 K. Además de estos estudios, se describe también el comportamiento volumétrico de aminoácidos (alanina y glicina) y péptidos a presiones hasta 100 MPa a partir de medidas de velocidad del sonido.<sup>8,24</sup>

## 7.2 Metodología específica

### 7.2.1 Preparación de las muestras

Las dos sustancias estudiadas en este capítulo han sido el NaL y el NaCas en disoluciones acuosas. Las características, referencias de cada sustancia y el modo de preparación de las disoluciones se indicaron en los capítulos 5 y 6, respectivamente.

### 7.2.2 Experimentos realizados

Las propiedades aparentes estudiadas han sido el volumen específico aparente y la compresibilidad adiabática aparente. Como se describió en la introducción de este capítulo en el apartado 7.1.1, el cálculo de estas propiedades deriva de las medidas de densidad y de velocidad del sonido. Ambas medidas se han llevado a cabo a presión atmosférica y a alta presión según la metodología descrita en el Capítulo 3 y conciernen tanto a la disolución como al disolvente, es decir, el agua, en las mismas condiciones de presión y temperatura.

En la Tabla 7.1 se resumen los experimentos realizados para cada sustancia estudiada.

**Tabla 7.1.** Resumen de las condiciones de los experimentos realizados para cada sustancia.

Sustancia	Presión	Temperatura	Concentración
NaL	0.1 MPa	283.15 – 333.15 K	0 – 0.1 mol·kg <sup>-1</sup>
	0.1 – 700 MPa	298.15 K	0.0295 mol·kg <sup>-1</sup>
NaCas	0.1 MPa	298.15 K	0 – 15 % p/p
	0.1 MPa	273.15 – 343.15 K	2.6 % p/p
	0.1 – 700 MPa	298.15 K	2.6 % p/p

## 7.3 Resultados

En este apartado se mostrarán los resultados de los experimentos llevados a cabo para el NaL y NaCas tanto a presión atmosférica como a alta presión para obtener las propiedades volumétricas aparentes.

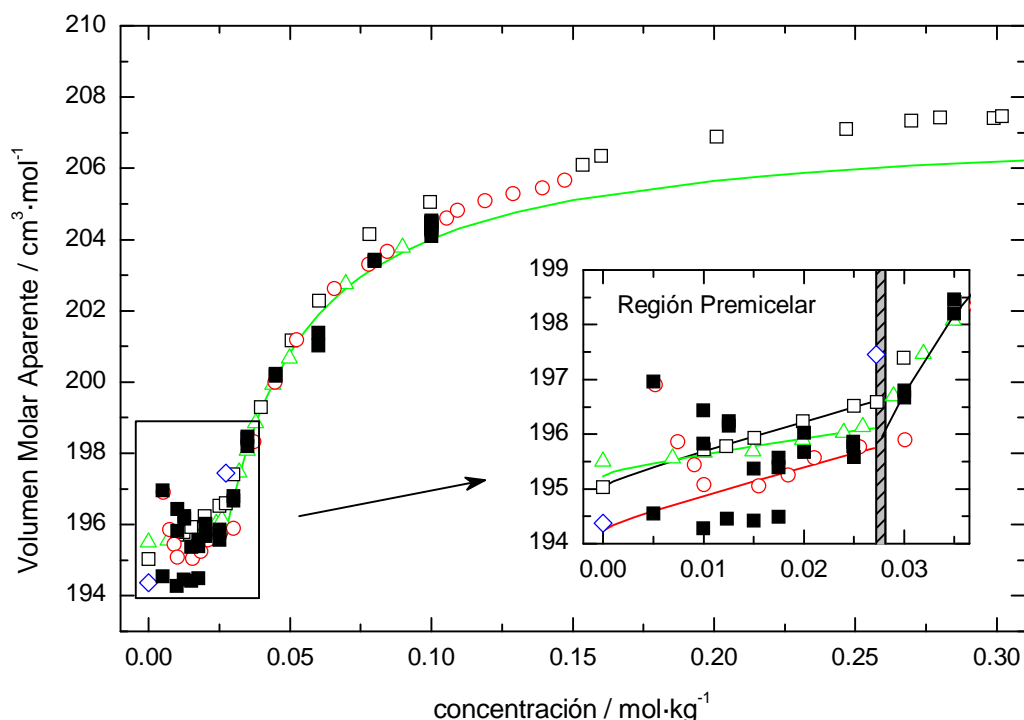
### 7.3.1 Resultados a presión atmosférica: comparación con estudios previos

En primer lugar se compararon los resultados obtenidos para el NaL a 298.15 K con los recogidos en la bibliografía<sup>25,26,27,28</sup> con el fin de comprobar que la metodología seguida era la correcta para la determinación de las propiedades aparentes. En la Figura 7.1 se muestra la variación del volumen molar aparente frente a la concentración a 298.15 K comparada con otros autores. Se puede observar cómo, a concentraciones bajas, la dispersión de los resultados es mayor. Esto se debe a que se está examinando indirectamente la diferencia entre la densidad de la disolución y del disolvente puro (véase la Ecuación 7.3). Como a concentraciones muy diluidas de NaL, la diferencia entre las densidades,  $(\rho - \rho_0)$ , es muy pequeña, llega a ser del mismo orden que la incertidumbre experimental en las densidades, lo que repercute en una mayor incertidumbre en  $V_\phi$ .

Se acepta que las disoluciones micelares en la región premicelar se comportan como sistemas dispersos sencillos y los valores de  $V_\phi$  se pueden describir con la siguiente ecuación:

$$V_\phi = V_\phi^0 + A_V m^{1/2} + B_V m + \dots \quad \text{Ecuación 7.10}$$

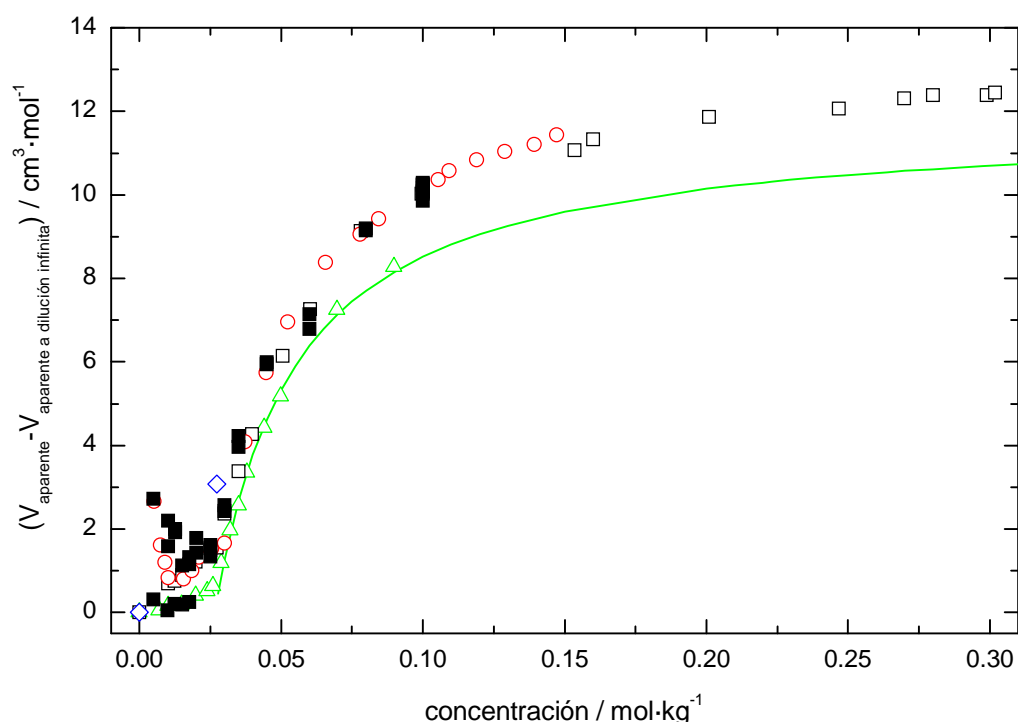
donde  $V_\phi^0$  es el volumen molar aparente a dilución infinita, es decir, el volumen de la molécula de tensioactivo,  $A_V$  es el coeficiente de la ley límite de Debye-Hückel y  $B_V$  es un parámetro de ajuste relacionado con el segundo coeficiente del virial que indica la desviación de la ley límite debido a las interacciones no electrostáticas soluto-soluto. Por el contrario, en la región postmicelar,  $V_\phi$  aumenta con la concentración de un modo más acusado, por lo que se han propuesto diferentes modelos para explicar este comportamiento.



**Figura 7.1.** Evolución del volumen molar aparente con la concentración molar. La línea continua representa la variación propuesta por la Ref. [25] para  $V_\phi$  en la región postmicelar según la ecuación  $V_\phi = V_\phi^{sat} \left[ \frac{m}{a+m} \right]$  ( $\triangle$ ) Brun y col.<sup>25</sup>, ( $\square$ ) Lisi y col.<sup>26</sup>, ( $\circ$ ) Huang y Verrall<sup>27</sup>, ( $\diamond$ ) Blanco y col.<sup>28</sup>, ( $\blacksquare$ ) este trabajo.

En la región premicelar se observa, para algunos autores y en este trabajo, incluso un mínimo en torno a  $0.015 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , seguido de un crecimiento suave hasta el valor de la CMC. Finalmente se aprecia un mayor crecimiento y una tendencia a la saturación para concentraciones mayores. Este valor de saturación se estima, según el modelo de Brun y col.<sup>25</sup>, en  $207 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ .

El estudio de  $\Delta V_\phi$  se puede hacer a partir de medidas de densidad, como se muestra en la Figura 7. 2, o bien, en función de la presión como sugiere Brun y col.<sup>25</sup> El valor de  $\Delta V_\phi$  a presión atmosférica toma un valor comprendido entre unos 10 y  $11 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  y desciende de forma continua con la presión tomando el valor cero en torno a 115 MPa, lo que indica que la variación de la CMC con la presión presenta un máximo a esta presión.

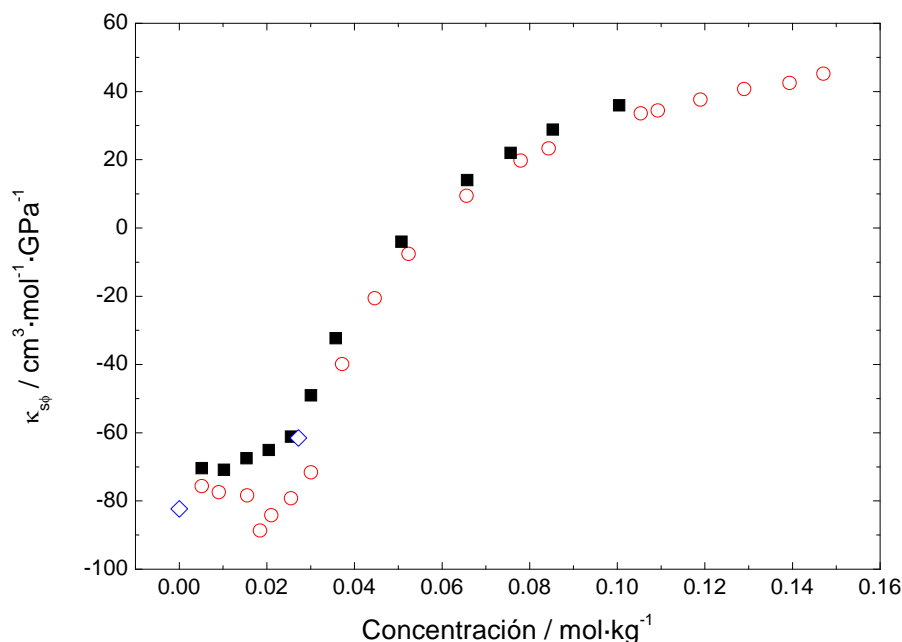


**Figura 7.2.** Evolución de la diferencia entre el volumen aparente y el volumen aparente a dilución infinita frente a la concentración a 298 K. ( $\triangle$ ) Brun y col.<sup>25</sup>, ( $\square$ ) Lisi y col.<sup>26</sup>, ( $\circ$ ) Huang y Verrall,<sup>27</sup> ( $\diamond$ ) Blanco y col.<sup>28</sup>, ( $\blacksquare$ ) este trabajo.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 7.2, los valores propuestos por Brun y col.<sup>25</sup> parecen mostrar un valor del volumen molar aparente a altas concentraciones ligeramente menor que el que caracteriza el comportamiento de otros resultados que existen en la bibliografía a más altas concentraciones, los obtenidos por Huang y Verrall<sup>27</sup> y por Lisi y col.<sup>26</sup> Esto se traduce en que la diferencia entre el volumen molar aparente a saturación y el volumen molar aparente a dilución infinita,  $\Delta V_\phi$ , tome un valor entre 12 y 13  $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ , en lugar de los 10-11  $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  que propone Brun a partir de medidas en función de la presión. Los datos de este trabajo en la zona postmicelar están de acuerdo con Huang y Verrall y Lisi y col.

Una vez comprobada que la metodología experimental es correcta para el cálculo del volumen molar aparente puesto que obtenemos resultados comparables con los recogidos en la bibliografía, el siguiente paso consistió en calcular la compresibilidad molar adiabática a la misma temperatura. En la Figura 7.3 se muestra la variación de esta propiedad con la concentración a 298.15 K comparada con otros datos de la bibliografía.





**Figura 7.3.** Comparación de la variación de la compresibilidad adiabática aparente con la concentración a 298.15 K. (◇) Blanco y col.<sup>28</sup> (○) Huang y Verrall<sup>27</sup> (■) Este trabajo.

Para concentraciones por encima de la CMC los datos experimentales son consistentes entre sí y tienen muy buen acuerdo con los de otros autores. A bajas concentraciones, no está claro el comportamiento que debe tener la compresibilidad adiabática aparente: según Blanco y col., ésta aumenta suavemente hasta la CMC y después se observa un cambio brusco de pendiente. Según Huang y Verrall, se produce un descenso, con un mínimo, seguido de un suave crecimiento hasta la CMC, para aumentar bruscamente a partir de ella. En el caso de los datos de esta tesis, la compresibilidad adiabática aparente aumenta hasta la CMC y a partir de ella se observa un cambio brusco de pendiente tan acusado como en el caso de Huang y Verrall.

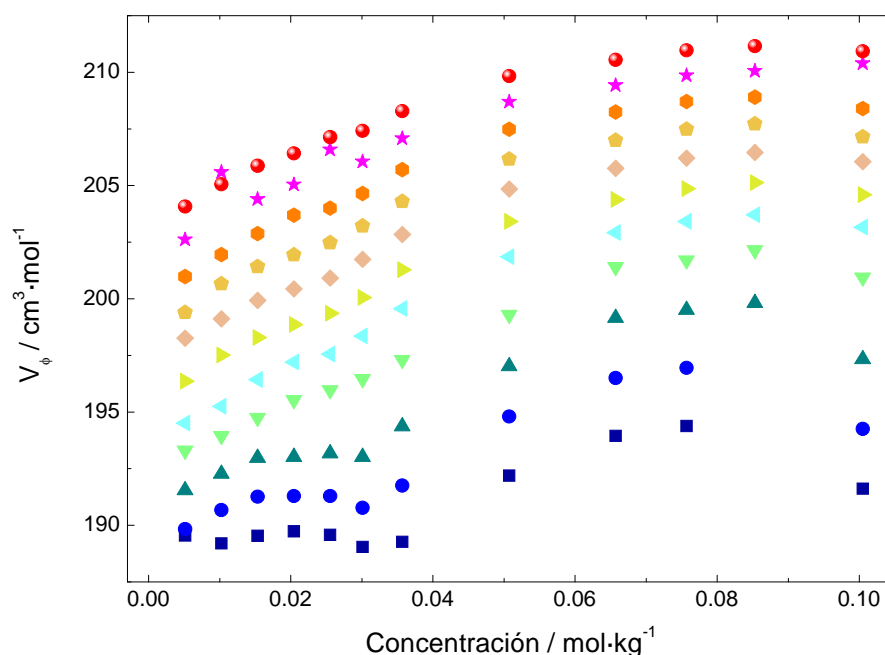
A la vista de los resultados obtenidos a 298.15 K para el NaL en el cálculo del volumen molar aparente y la compresibilidad molar adiabática aparente, podemos afirmar que la metodología utilizada es correcta y los resultados obtenidos son consistentes y comparables a los presentados por otros autores en las mismas condiciones. Por tanto, procedemos a comentar el comportamiento de estas dos propiedades en función de la concentración y temperatura para el NaL y NaCas a presión atmosférica y, posteriormente, en función de la presión a concentración y temperatura constantes.

### 7.3.1.1 Efecto de la concentración sobre las propiedades aparentes

- **Dodecanoato de sodio**

#### *Volumen molar aparente*

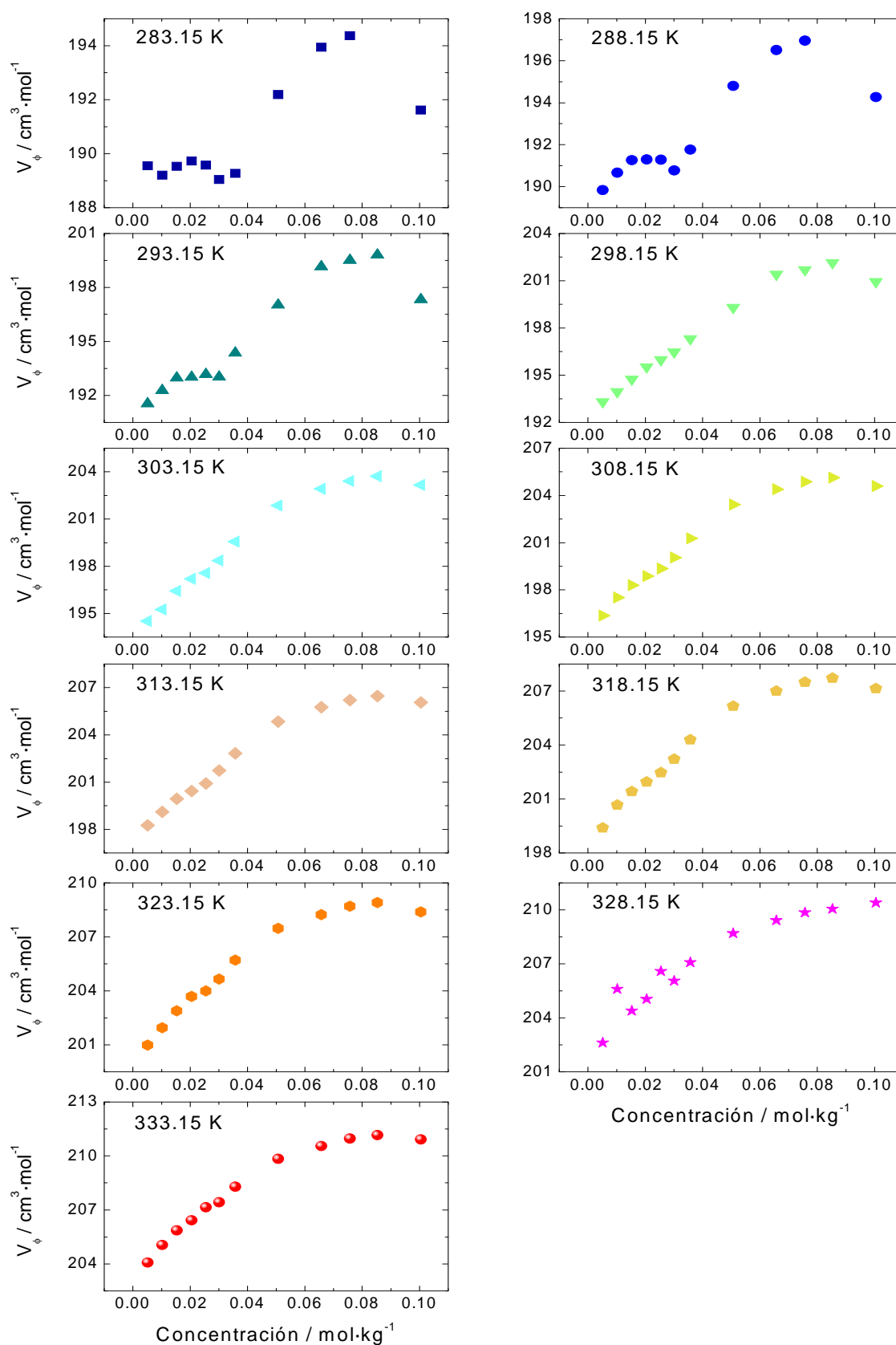
Para estudiar el efecto de la concentración en el NaL se eligieron una serie de concentraciones que cubrieran la región premicelar y postmicelar. El estudio del efecto de la concentración sobre  $V_\phi$  se hizo para temperaturas desde 283.15 K hasta 333.15 K. En la Figura 7.4 se muestra la variación de  $V_\phi$  con la concentración para cada temperatura estudiada. Podemos ver cómo, en general y a excepción de la concentración más alta,  $V_\phi$  aumenta en todo el intervalo de concentración. El crecimiento es mayor en la región premicelar que en la postmicelar. La pendiente de crecimiento de la región premicelar (concentraciones por debajo de  $0.030 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  en general) es paralela para temperaturas superiores a 298.15 K, y para las tres temperaturas más bajas estudiadas, 283.15 K, 288.15 K y 293.15 K, la pendiente es similar entre ellas tres, pero diferente al resto. Además también podemos observar en la Figura 7.4 cómo la variación de  $V_\phi$  es diferente entre la región premicelar y postmicelar: en la región premicelar el crecimiento es lineal, excepto para las tres isoterms más bajas, y en la región postmicelar se observa cierta curvatura en la variación de  $V_\phi$  con la concentración, observando un máximo en torno a  $0.085 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  y disminuyendo posteriormente en la concentración más alta estudiada.



**Figura 7.4.** Variación del volumen aparente con la concentración para todas las temperaturas estudiadas. (■) 283.15 K, (●) 288.15 K, (▲) 293.15 K, (▼) 298.15 K, (◄) 303.15 K, (►) 308.15 K, (◆) 313.15 K, (●) 318.15 K, (●) 323.15 K, (★) 328.15 K, (●) 333.15 K.

En la Figura 7.5 se muestra, por separado, para cada isoterma, la variación de  $V_\phi$  con la concentración. Para la concentración más baja estudiada,  $0.005 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  el valor de  $V_\phi$  varía desde unos  $189.5 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  a  $283.15 \text{ K}$  hasta unos  $202.5 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  a  $333.15 \text{ K}$ , lo que representa un incremento del 7 %. Para la concentración más alta estudiada,  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  el volumen específico aparente toma un valor de unos  $191.5 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  a la isoterma más baja estudiada y unos  $210.5 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  en la isoterma de  $333.15 \text{ K}$ , lo que representa un incremento de prácticamente un 10 %. Para una concentración próxima a la CMC, por ejemplo  $0.030 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  el incremento de  $V_\phi$  es del 10 % desde  $283.15 \text{ K}$  a  $333.15 \text{ K}$ .

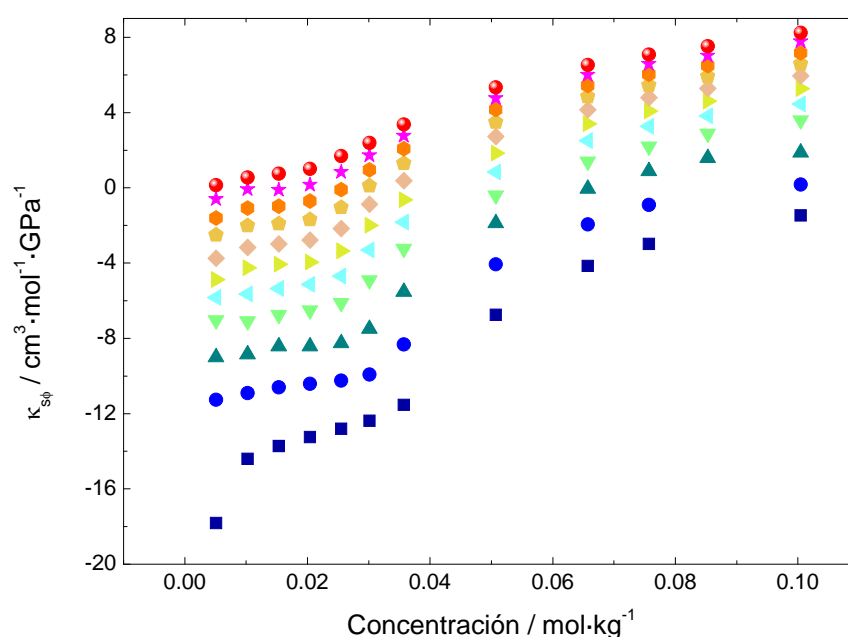
Para una isoterma dada, la variación con la concentración es de un 3.5 % para temperaturas por encima de  $298.15 \text{ K}$ , y poco más del 1 % para temperaturas por debajo de  $298.15 \text{ K}$ .



**Figura 7.5.** Variación del volumen aparente con la concentración para todas las temperaturas estudiadas en esta tesis. (■) 283.15 K, (●) 288.15 K, (▲) 293.15 K, (▼) 298.15 K, (◄) 303.15 K, (►) 308.15 K, (◆) 313.15 K, (⬡) 318.15 K, (●) 323.15 K, (★) 328.15 K, (●) 333.15 K.

### Compresibilidad adiabática aparente

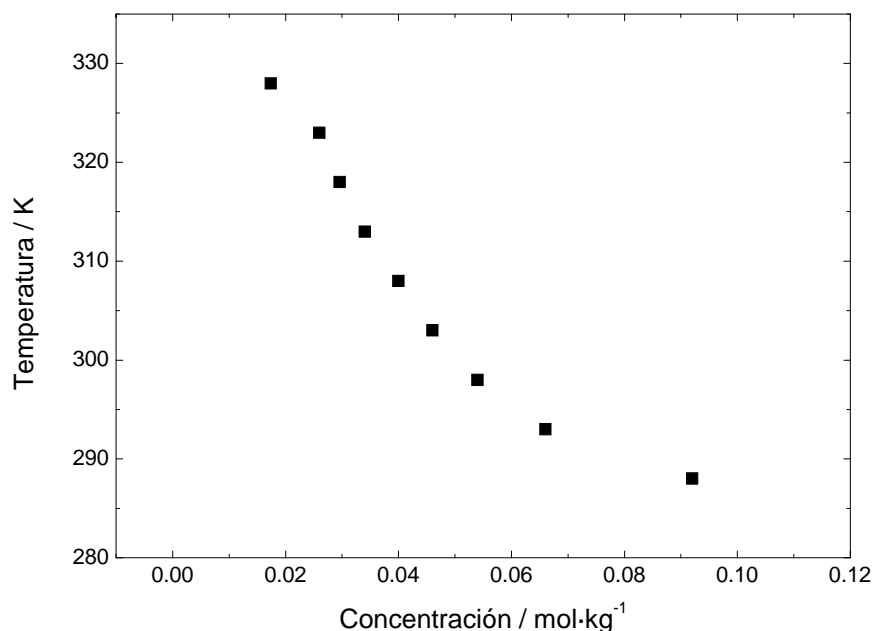
Posteriormente, haciendo uso conjunto de las medidas de densidad y velocidad del sonido se determinó la compresibilidad adiabática,  $\kappa_{s\phi}$ , en función de la concentración en el intervalo de temperaturas de 283.15 K a 333.15 K, haciendo uso de la Ecuación 7.7. En la Figura 7.6 se muestran dichos resultados, donde podemos apreciar cómo  $\kappa_{s\phi}$  aumenta en todo el intervalo de concentración para cada isoterma. Podemos apreciar cómo en la región premicelar la variación es menor, hasta  $0.025 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  aproximadamente. En esta región no se ha alcanzado todavía la CMC y únicamente hay monómeros en disolución, por lo que el valor de  $\kappa_{s\phi}$  se mantiene prácticamente constante. Cuando sobrepasamos la CMC se produce un cambio en el comportamiento de  $\kappa_{s\phi}$ , ésta aumenta de forma brusca en un intervalo estrecho de concentración. Este hecho se explica debido a que están apareciendo en el seno de la disolución agregados micelares que son mucho más compresibles que los monómeros en disolución, en los que prácticamente sólo está el disolvente puro y éste es poco compresible. A partir de  $0.065 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  el aumento de la compresibilidad con la concentración es más lento. Estas observaciones son válidas para todas las isotermas estudiadas.



**Figura 7.6.** Variación de la compresibilidad adiabática aparente,  $\kappa_{s\phi}$ , con la concentración para las diferentes temperaturas estudiadas. (■) 283.15 K, (●) 288.15 K, (▲) 293.15 K, (▼) 298.15 K, (◀) 303.15 K, (▶) 308.15 K, (◆) 313.15 K, (◇) 318.15 K, (◐) 323.15 K, (☆) 328.15 K, (●) 333.15 K.

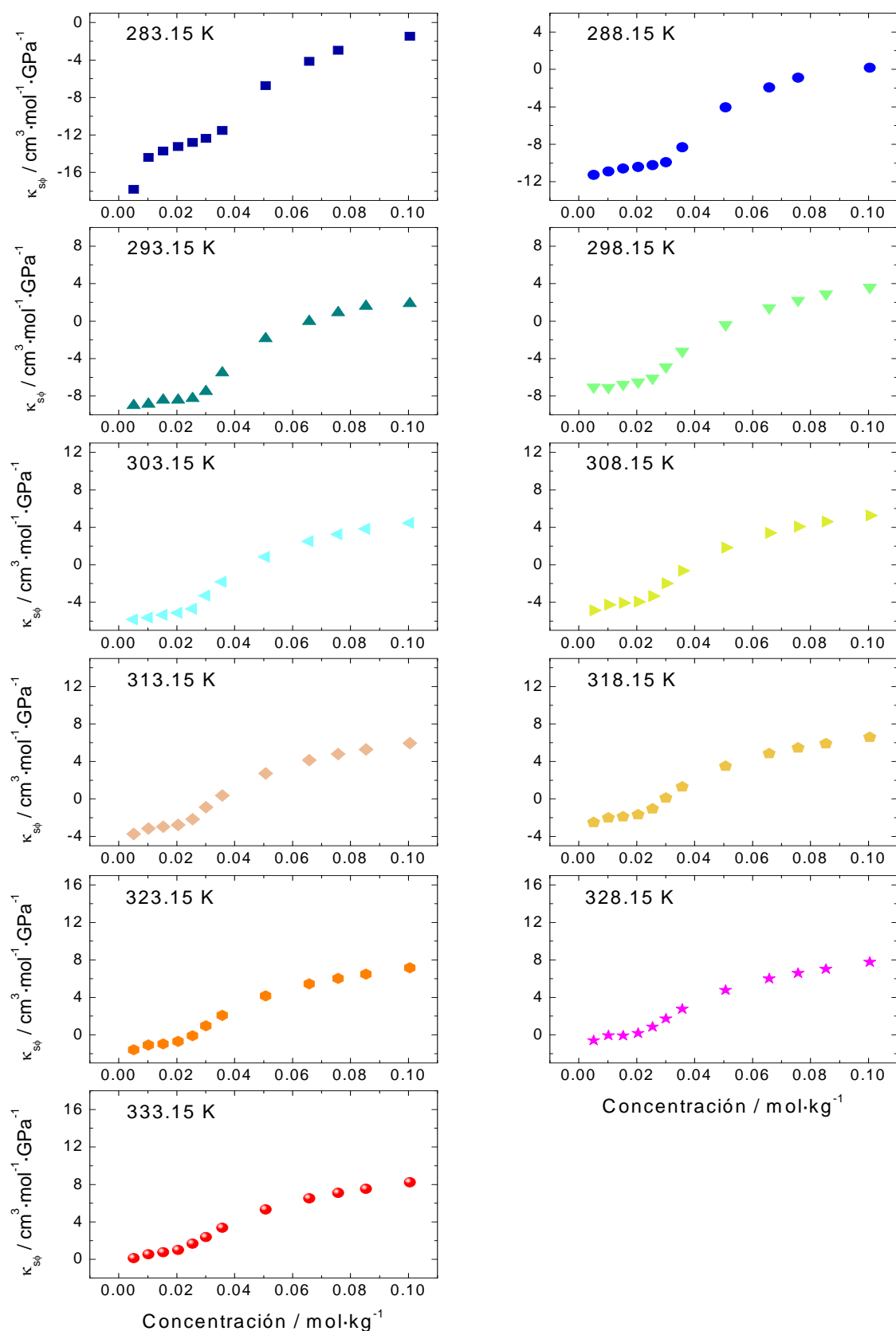
Resulta interesante ver el valor al que  $\kappa_{s\phi}$  toma el valor cero para cada concentración. Este hecho se ha representado en la Figura 7.7 en donde se representa

la variación de la temperatura con la concentración cuando  $\kappa_{s\phi}$  es cero. Se observa un comportamiento sigmoideo y parece que asintótico a concentraciones altas y temperaturas bajas.



**Figura 7.7.** Variación con la concentración de la temperatura a la que  $\kappa_{s\phi}$  toma el valor cero para el NaL.

En la Figura 7.8 se representa la variación de  $\kappa_{s\phi}$  con la concentración por separado para cada isoterma. Es esta figura es posible apreciar más claramente la variación con la concentración y distinguir el comportamiento sigmoideo de la compresibilidad adiabática aparente en el que se aprecian tres regiones bien diferenciadas: la región premicelar en la que apenas varía  $\kappa_{s\phi}$ , la región central en la que se acaba de sobrepasar la CMC y empiezan a aparecer las micelas, y la última región que corresponde a concentraciones elevadas alejadas de la CMC donde la compresibilidad aumenta pero de forma más suave.

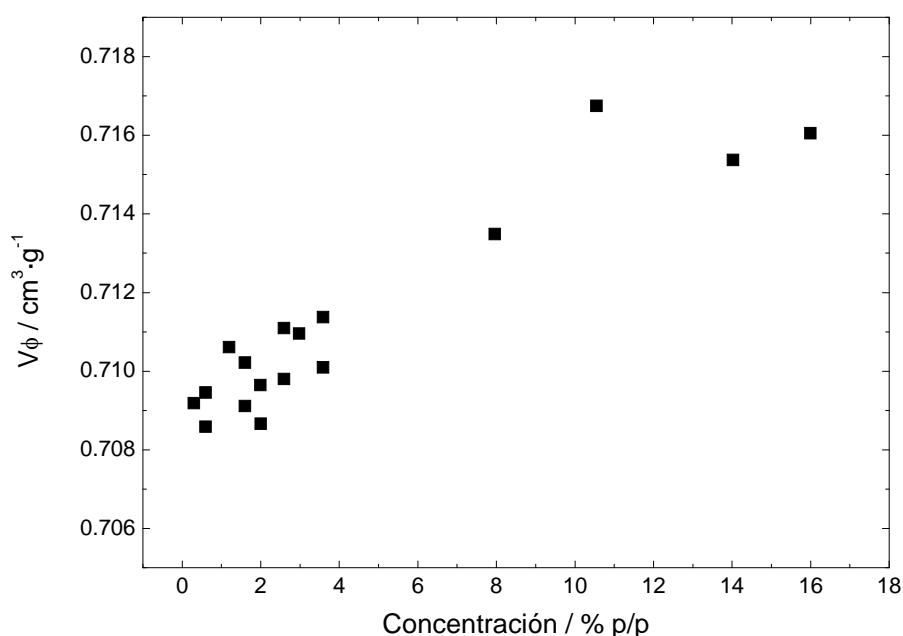


**Figura 7.8.** Variación de la compresibilidad adiabática aparente,  $\kappa_{s\phi}$  con la concentración para las diferentes temperaturas estudiadas. (■) 283.15 K, (●) 288.15 K, (▲) 293.15 K, (▼) 298.15 K, (◄) 303.15 K, (►) 308.15 K, (◆) 313.15 K, (⬡) 318.15 K, (○) 323.15 K, (★) 328.15 K, (●) 333.15 K.

- **Caseinato de sodio**

***Volumen específico aparente***

Se ha hecho un estudio similar para el volumen específico en el NaCas, en este caso la variación de  $V_\phi$  con la concentración se hizo únicamente a 298.15 K dada la complejidad que presenta este sistema. La determinación de  $V_\phi$  se llevó a cabo haciendo uso de la Ecuación 7.2. En la Figura 7.9 se muestra la variación de  $V_\phi$  con la concentración a 298.15 K.



**Figura 7.9.** Variación del volumen específico aparente,  $V_\phi$ , con la concentración para el NaCas a 298.15 K.

En la Figura 7.9 puede observarse cómo existe cierta dispersión en el valor de  $V_\phi$  a baja concentración de NaCas, donde se prepararon un mayor número de disoluciones. Este hecho se debe a que, como se puede comprobar en la Ecuación 7.2, se utiliza la diferencia de los volúmenes específicos de la disolución y el disolvente puro, y a concentraciones diluidas, la diferencia de densidades entre la disolución y el disolvente puro es muy pequeña. Para concentraciones por encima de 0.3 % p/p, esta dispersión es inferior al 0.5 %.

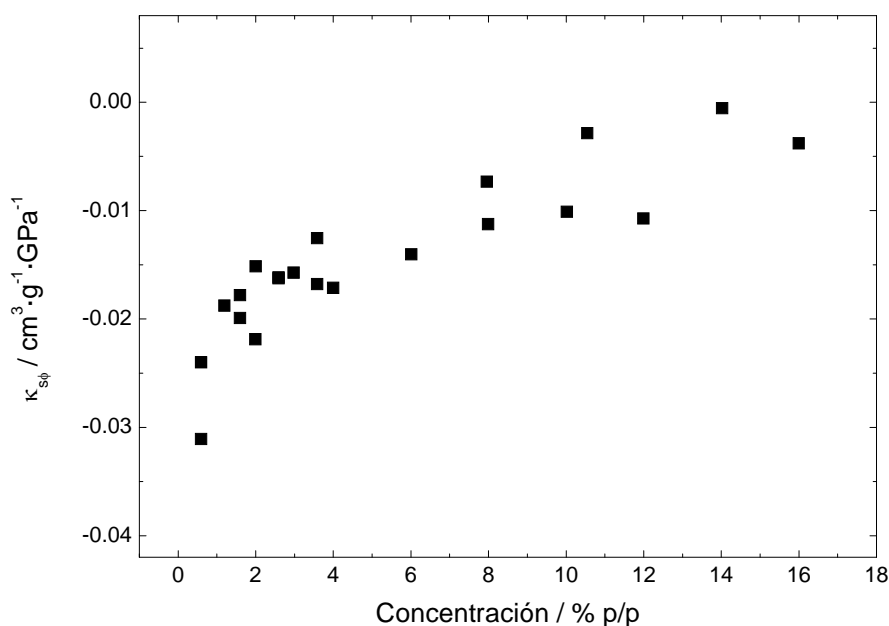
$V_\phi$  apenas aumenta con la concentración: el incremento es de menos del 1 % en todo el intervalo de concentración. Por lo tanto, dada la incertidumbre experimental, podemos considerar, que  $V_\phi$  se mantiene constante con la concentración. Al igual que se ha observado para otras proteínas, la cuasi independencia del volumen específico



aparente con la concentración permite asimilarlo, en primera aproximación, al volumen específico parcial de la proteína. La extrapolación del valor de  $V_\phi$  a dilución infinita da un valor de  $0.709 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  y a la concentración de 2.6 % p/p, es de  $0.710 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ . Este valor es un poco inferior al encontrado por McMeekin, Groves & Hipp<sup>29</sup> para caseína ácida redispersada en medio alcalino y que era de  $0.731 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  en promedio a pH 6.4, 298 K y concentraciones similares. Esta diferencia se atribuye al distinto procedimiento adoptado para preparar las disoluciones, a la diferencia de pH (en nuestro caso el pH fue de 6.7-6.9) y a los distintos disolventes utilizados (agua versus agua con NaOH) para determinar el volumen específico aparente. La contribución de los iones se toma en cuenta de forma diferente en cada caso: en nuestro caso, está incluida en el volumen aparente de las caseínas mientras que en el segundo caso, está incluida a través del disolvente.

### **Compresibilidad adiabática aparente**

Para la determinación de la compresibilidad adiabática aparente,  $\kappa_{s\phi}$ , a 298.15 K se ha hecho uso de la Ecuación 7.6. En la Figura 7.10 se representa la variación de  $\kappa_{s\phi}$  con la concentración.



**Figura 7.10.** Variación de la compresibilidad adiabática aparente con la concentración para el NaCas a 298.15 K.

La dispersión de los valores refleja, como se comentó anteriormente, la mayor incertidumbre en la determinación de las propiedades aparentes a bajas concentraciones. También refleja la reproducibilidad del experimento al incluir

resultados de disoluciones de NaCas preparadas en épocas distintas y no necesariamente por dilución de la más concentrada, en particular a las concentraciones más altas. Se observa que  $\kappa_{s\phi}$  aumenta suavemente con la concentración en una tendencia lineal. La extrapolación a dilución infinita da un valor de  $-0.02 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{GPa}^{-1}$ , el mismo valor que para una concentración al 2.6 % p/p de NaCas. Por lo tanto, podemos aproximar la compresibilidad adiabática específica parcial del NaCas por la compresibilidad adiabática aparente a esa concentración.

Para interpretar los cambios en las propiedades aparentes del NaCas con la concentración, recordemos que el proceso de agregación de las caseínas no es un proceso de agregación clásico en el que a partir de una concentración dada, CMC, comienzan a aparecer agregados, sino que se trata de un proceso de agregación progresivo en el que continuamente se van formando agregados. La formación de estos agregados implica que se formen huecos entre las proteínas. Estos contribuyen al aumento del volumen específico aparente y también de la compresibilidad adiabática aparente ya que son altamente compresibles comparado a las proteínas en sí y al agua de interacción. En paralelo, la formación de agregados conlleva a una disminución de la superficie total de las interfaces de interacción de las caseínas con el agua. El agua de la capa de hidratación de las proteínas es más densa y menos compresible que el resto del agua de la disolución. En consecuencia, disminuye su contribución a las propiedades aparente lo que repercute también un aumento de ambas propiedades tal y como se observa. Globalmente, la agregación de las caseínas no pone en juego cambios en  $V_\phi$  y  $\kappa_{s\phi}$  mayores que  $0.006 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  y  $0.03 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{GPa}^{-1}$ , respectivamente.

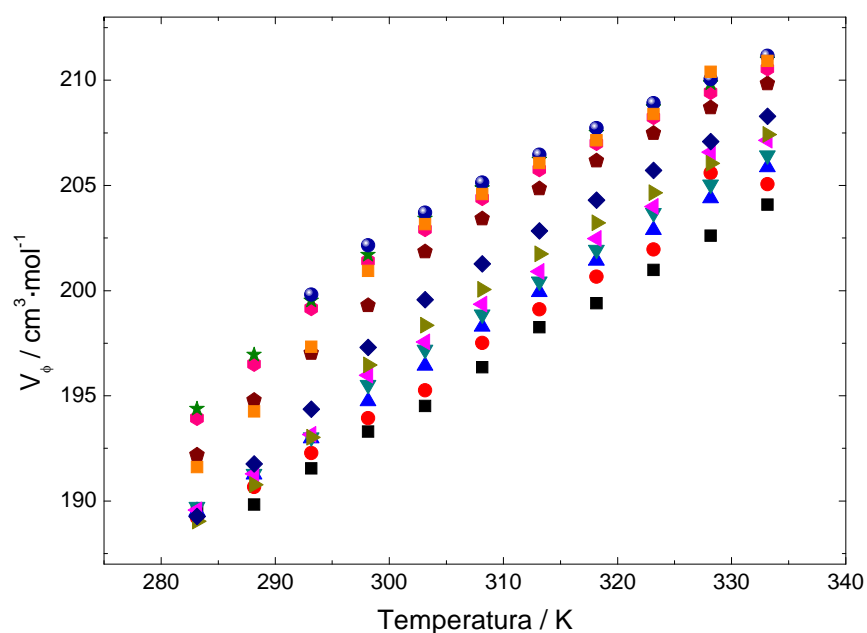
### 7.3.1.2 Efecto de la temperatura sobre las propiedades aparentes

A continuación se expondrán los resultados obtenidos para los experimentos en función de la temperatura, tanto para el NaL como para el NaCas.

- **Dodecanoato de sodio**

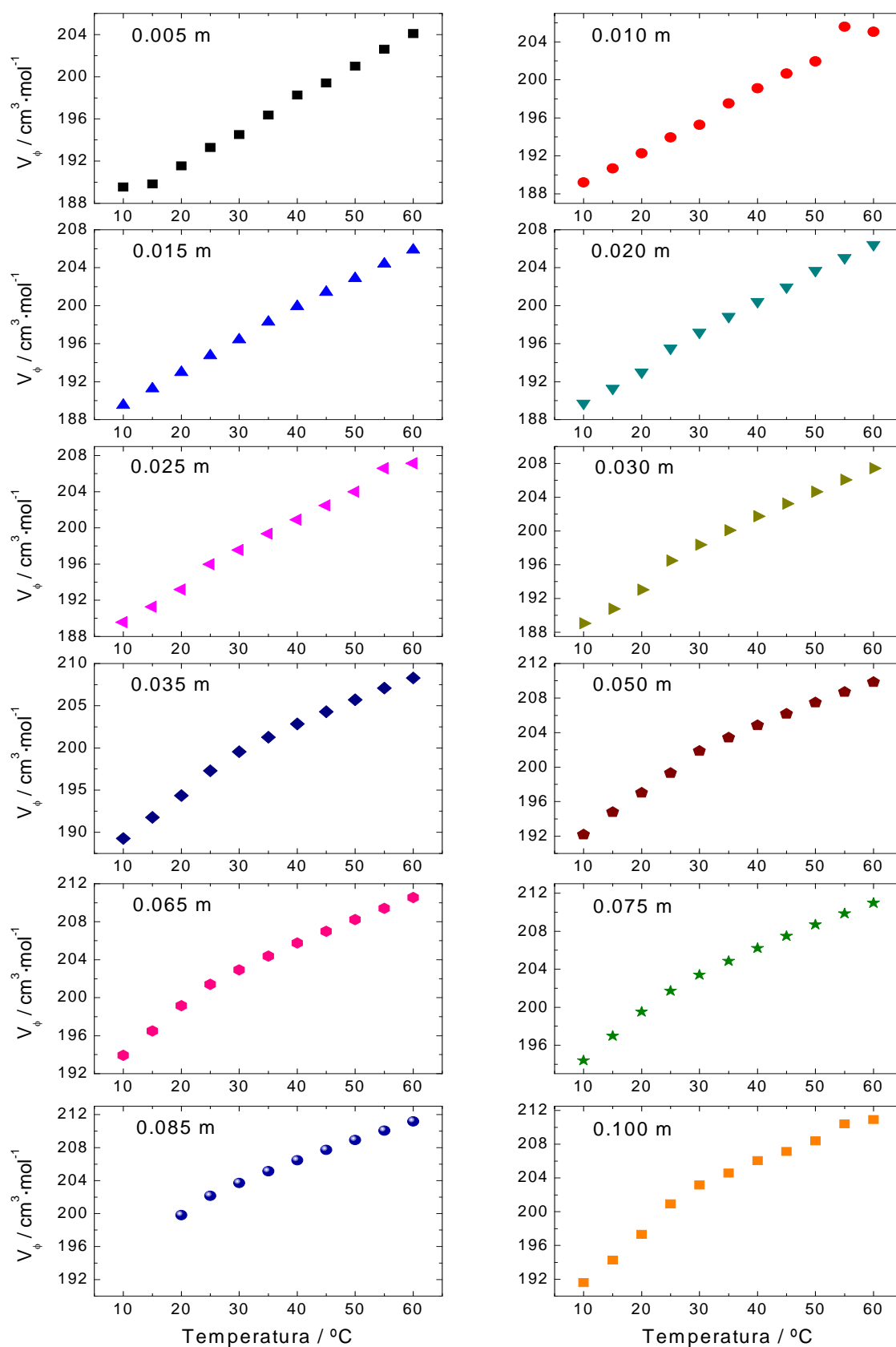
#### ***Volumen específico aparente***

Se puede hacer un análisis similar al del apartado 7.3.1.1 para el volumen aparente en este caso en función de la temperatura para cada concentración utilizando la Ecuación 7.3. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.11.



**Figura 7.11.** Variación del volumen aparente  $V_\phi$  con la temperatura para el NaL. (■) 0.005 ; (●) 0.010 ; (▲) 0.015 ; (▼) 0.020; (◀) 0.025; (▶) 0.030; (◆) 0.035; (◆) 0.050; (◐) 0.065; (★) 0.075; (●) 0.085; (■) 0.100 mol·kg<sup>-1</sup>.

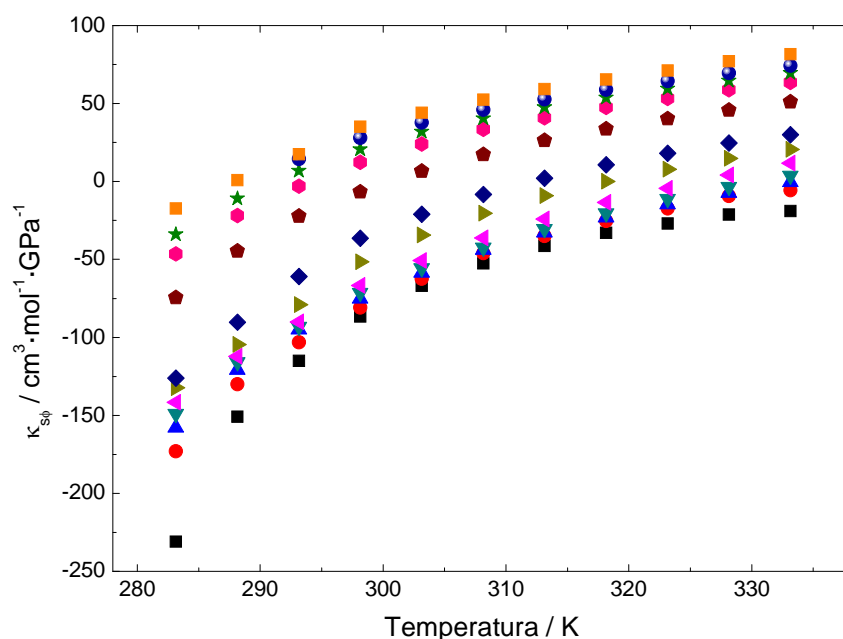
Como se puede ver en la Figura 7.11,  $V_\phi$  aumenta en todo el intervalo de temperatura tanto para las concentraciones que se encuentran por debajo de la CMC como para las que se encuentran por encima. Se puede apreciar cómo la variación con la temperatura es más lineal para concentraciones premicelares y para concentraciones por encima de la CMC la variación de  $V_\phi$  comienza a presentar cierta curvatura a partir de 298.15 K. Esta observación se puede apreciar más claramente en la Figura 7.12 en la que se representan por separado la variación de  $V_\phi$  con la temperatura para todas la concentraciones estudiadas.



**Figura 7.12.** Variación del volumen aparente con la temperatura para todas las concentraciones estudiadas.  $m = \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$  (■) 0.005; (●) 0.010; (▲) 0.015; (▼) 0.020; (◆) 0.025; (▴) 0.030; (◆) 0.035; (◆) 0.050; (◆) 0.065; (★) 0.075; (●) 0.085; (■) 0.100  $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

### Compresibilidad adiabática aparente

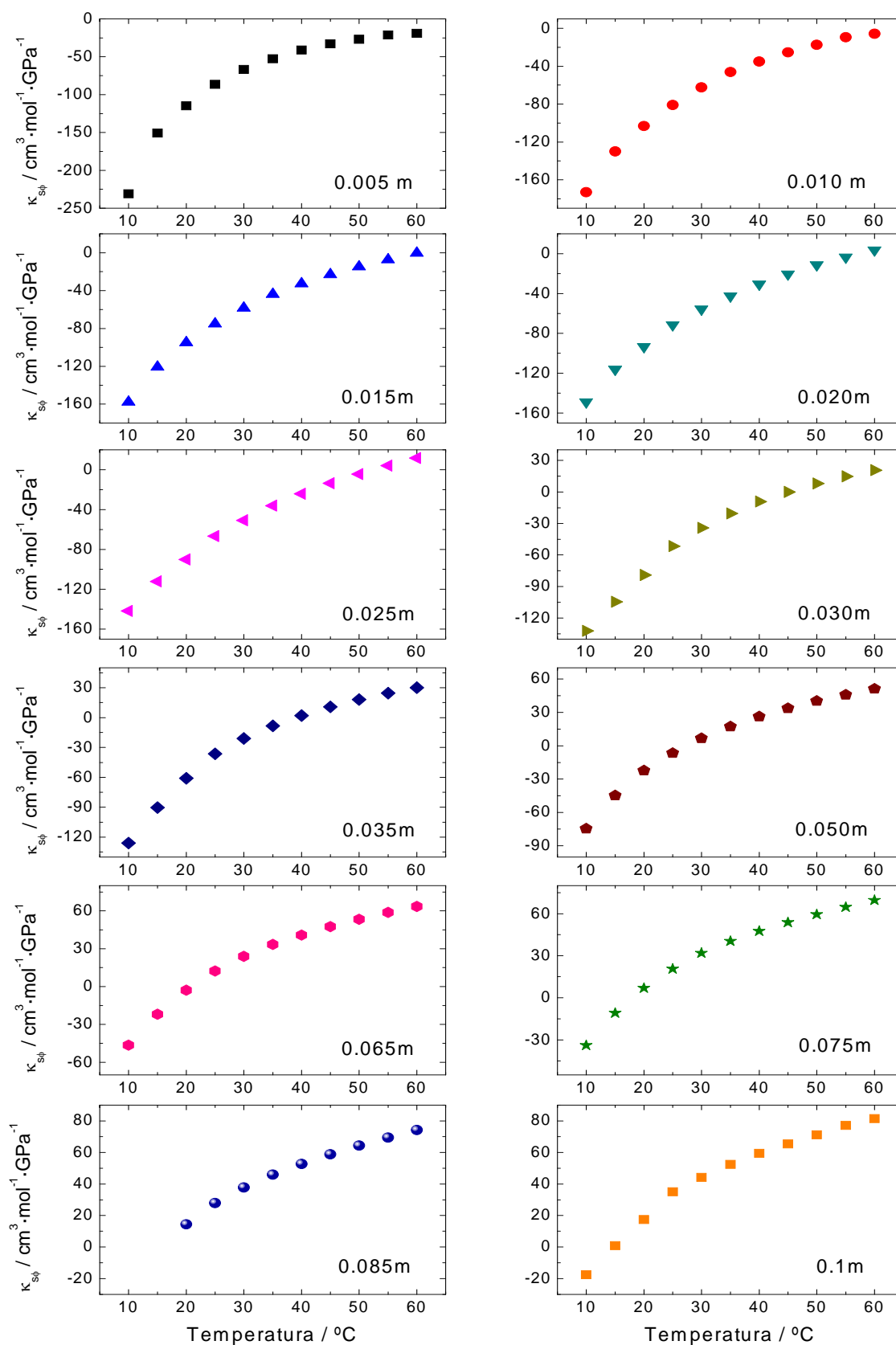
En lo que se refiere a la compresibilidad adiabática aparente,  $\kappa_{s\phi}$ , ésta se determinó utilizando la Ecuación 7.7 en función de la temperatura para todas las concentraciones estudiadas. En la Figura 7.13 podemos ver dicha variación. Se observa claramente cómo a concentraciones bajas, la variación de  $\kappa_{s\phi}$  con la temperatura es mayor a bajas concentraciones, la CMC marca un comportamiento diferente para la variación de  $\kappa_{s\phi}$  con la temperatura para las regiones premicelar y postmicelar. La variación para la concentración de  $0.005 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  desde  $283.15 \text{ K}$  hasta  $333.15 \text{ K}$  es de  $91 \%$  y para la concentración más alta estudiada,  $0.100 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  es de un orden de magnitud.



**Figura 7.13.** Variación de la compresibilidad adiabática aparente con la temperatura para las disoluciones de NaL estudiadas. (■) 0.005; (●) 0.010; (▲) 0.015; (▼) 0.020; (◄) 0.025; (◄) 0.030; (◆) 0.035; (◆) 0.050; (◆) 0.065; (★) 0.075; (●) 0.085; (■) 0.100  $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

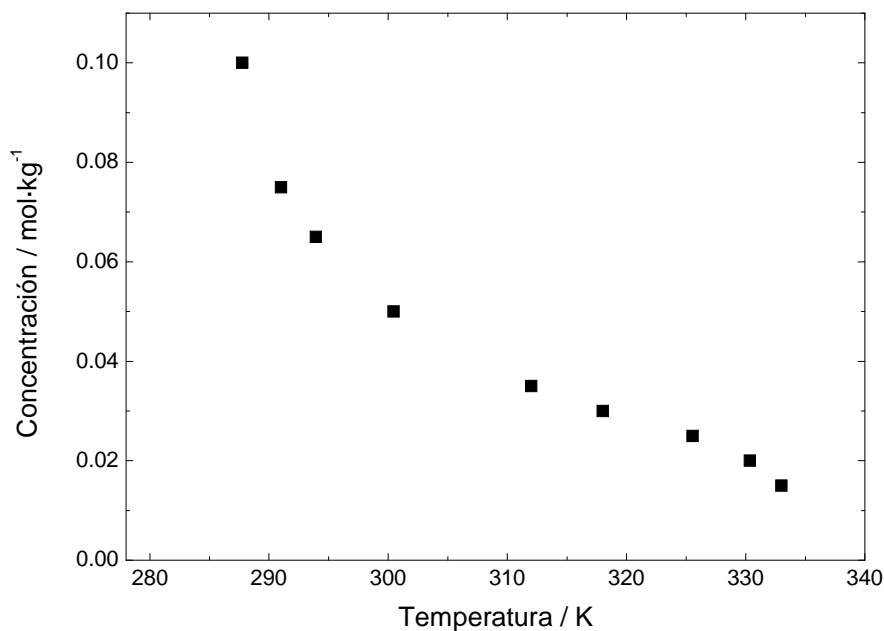
También se puede apreciar cómo a temperaturas bajas es cuando se produce la mayor variación de  $\kappa_{s\phi}$  y a partir de  $308.15 \text{ K}$  la variación es menor, tiende a un comportamiento asintótico.

En la Figura 7.14 podemos ver por separado para cada disolución la dependencia de  $\kappa_{s\phi}$  con la temperatura.



**Figura 7.14.** Variación de la compresibilidad adiabática aparente con la temperatura para las disoluciones de NaL estudiadas. (■) 0.005; (●) 0.010; (▲) 0.015; (▼) 0.020; (◀) 0.025; (▶) 0.030; (◆) 0.035; (◆) 0.050; (●) 0.065; (★) 0.075; (●) 0.085; (■) 0.100 mol·kg<sup>-1</sup>.

Resulta interesante comprobar el valor de temperatura al que  $\kappa_{s\phi}$  se hace cero para cada disolución. Este hecho se ha representado en la Figura 7.15.



**Figura 7.15.** Variación de la concentración con la temperatura para el valor en el que  $\kappa_{s\phi}$  toma el valor cero.

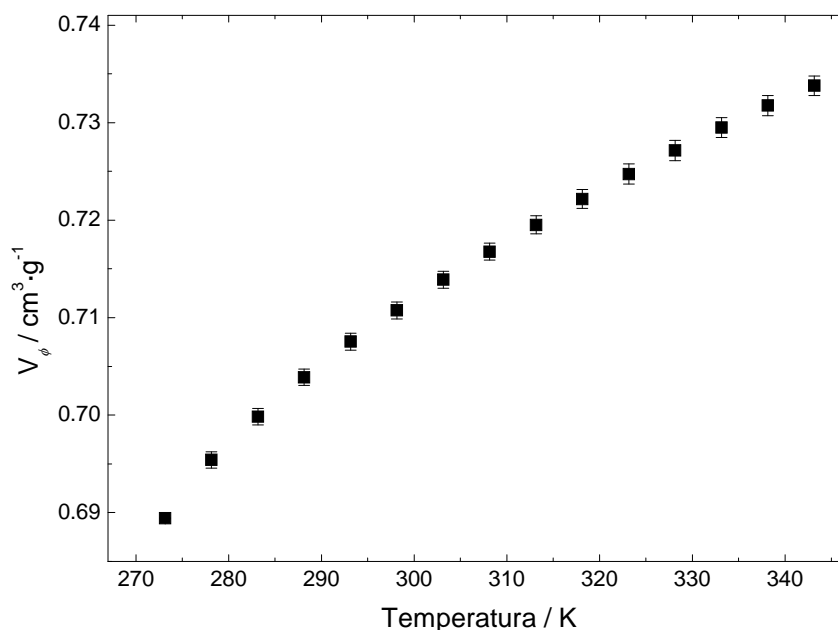
En la Figura 7.15 podemos apreciar cómo para concentraciones elevadas, el valor al que  $\kappa_{s\phi}$  toma el valor cero disminuye rápidamente con la temperatura, en cambio, para bajas concentraciones, la compresibilidad disminuye lentamente o incluso nunca llega a tomar el valor cero, como ocurre a las concentraciones más bajas estudiadas:  $0.005 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  y  $0.010 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Se trata de concentraciones tan diluidas en las que hay pocos monómeros en disolución y su comportamiento es muy similar al del disolvente puro por lo que no es posible determinar el valor de la compresibilidad adiabática aparente.

- **Caseinato de sodio**

***Volumen específico aparente***

En el caso del NaCas, se ha utilizado la Ecuación 7.2 para calcular  $V_\phi$  en función de la temperatura para una disolución de concentración 2.6 %. Como se puede comprobar en la Figuras 7.16,  $V_\phi$  aumenta con la temperatura. Se comprueba que las caseínas son estables con la temperatura, al menos en el rango estudiado. Esta estabilidad con la temperatura es característica de las proteínas flexibles, es decir, con una compresibilidad adiabática específica aparente relativamente alta. Como se verá

en el siguiente apartado en el que se discuten los resultados para  $\kappa_{s\phi}$ . La incertidumbre sobre  $V_\phi$  fue del orden de  $0.001 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$



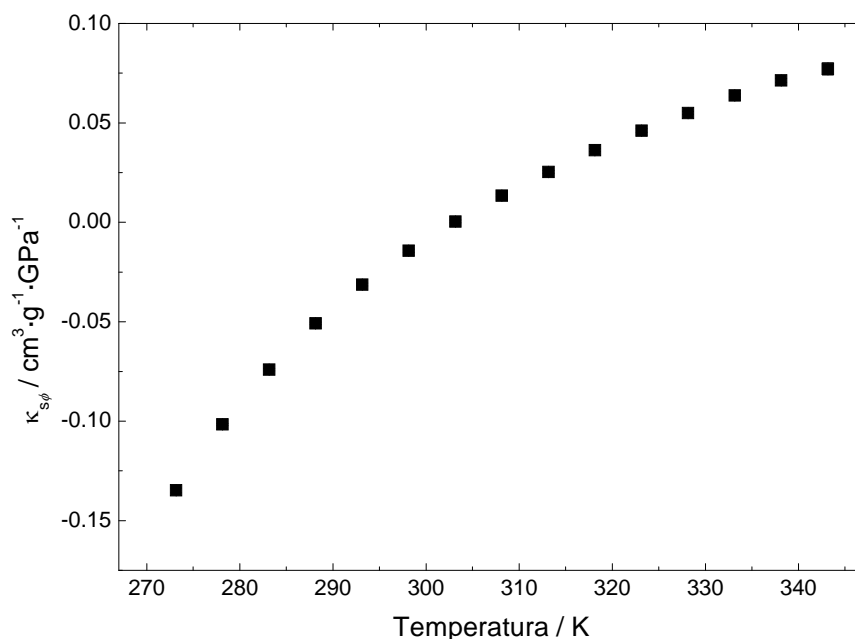
**Figura 7.16.** Variación del volumen específico aparente  $V_\phi$  frente a la temperatura para una disolución de NaCas del 2.6 % p/p.

El volumen específico aparente aumenta  $0.045 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  en el intervalo de temperatura estudiado, es decir, un 6.5 % aproximadamente.

### ***Compresibilidad adiabática aparente***

En el caso de compresibilidad adiabática aparente ocurre algo similar al volumen específico aparente, ésta también aumenta con la temperatura. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.17. La compresibilidad adiabática aparente,  $\kappa_{s\phi}$  aumenta unos  $0.20 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{GPa}^{-1}$  en el intervalo de temperatura estudiado y la incertidumbre sobre  $\kappa_{s\phi}$  fue del orden de  $0.016 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{GPa}^{-1}$ . Este aumento se interpreta en términos de incremento del volumen de los agregados al unirse más caseínas a esos agregados. La hidratación de las proteínas sufre un descenso por efecto de la temperatura permitiendo así la unión con otras de características similares. Al descender la temperatura ocurre lo contrario, las partículas se desagregan debido al efecto de las bajas temperaturas, permaneciendo en fase de monómeros o agregados de menor tamaño, por lo que la hidratación de los mismos aumenta y los volúmenes de los huecos y de agitación térmica disminuyen, por tanto, el valor de  $\kappa_{s\phi}$  disminuye también.





**Figura 7.17.** Variación de la compresibilidad adiabática específica aparente,  $\kappa_{s\phi}$  frente a la temperatura para una disolución de NaCas del 2.6 % p/p.

En torno a 303.15 K se observa que  $\kappa_{s\phi}$  toma un valor nulo. Esto se atribuye a la cancelación de las contribuciones de las cavidades y de la agitación térmica con las de la hidratación. Portanaya y col.<sup>30</sup> observaron que en disoluciones de caseína  $\beta$  se producía un crecimiento continuo de los agregados hasta una temperatura de 303.15 K propuesto en el modelo de cáscara, *shell model*, y afirmaron que por encima de esta temperatura se producía un cambio en la cinética de micelización originándose un cambio en los mecanismos de asociación. Podemos comparar estos resultados con los obtenidos en esta tesis ya que, como se observa en la Figura 7.17, sobre 303.15 K ocurre este hecho que se acaba de comentar. Por ello se podrían asociar los cambios observados por Portanaya y col.<sup>30</sup> a la temperatura antes mencionada con los obtenidos en este estudio.

### 7.3.2 Resultados a alta presión

En este apartado se presentan los resultados correspondientes al estudio del NaL y el NaCas a alta presión. Se han llevado a cabo experimentos de velocidad del sonido y cambio de volumen, utilizando las técnicas y dispositivos experimentales descritos en el Capítulo 3. El objetivo es tener un conocimiento lo más amplio posible del comportamiento del NaL y NaCas bajo presión, mediante el estudio y análisis de sus propiedades termofísicas, para evaluar la interacción agua – agregado.

### 7.3.2.1 Determinación del volumen específico aparente a alta presión

- **Dodecanoato de sodio**

El estudio de propiedades aparentes para el NaL se ha llevado a cabo para la concentración de  $0.0295 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , como quedó recogido en la Tabla 7.1. El motivo de la elección de esta concentración es que si nos fijamos en el diagrama de fases deducido para el NaL en el Capítulo 5 (véase Figura 5.18), esta concentración es muy particular. A presión atmosférica esta disolución se encuentra ligeramente por encima de la CMC, por lo que ya han aparecido agregados en el seno de la misma. Si aumentamos ligeramente la presión, atravesamos el dominio de cambio de fase (micela-monómero), pasando a una zona en la que estamos por debajo de la CMC y por tanto únicamente habrá monómeros en disolución. Por último, parar presiones elevadas, se vuelve a atravesar la línea de cambio de fase quedando la CMC a alta presión por debajo de  $0.0295 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  y teniendo agregados o soluto hidratado precipitado en la disolución.

Lo que se pretende al hacer medidas volumétricas a esta concentración tan particular es observar cambios en las propiedades aparentes que nos puedan informar sobre la interacción agua – agregado.

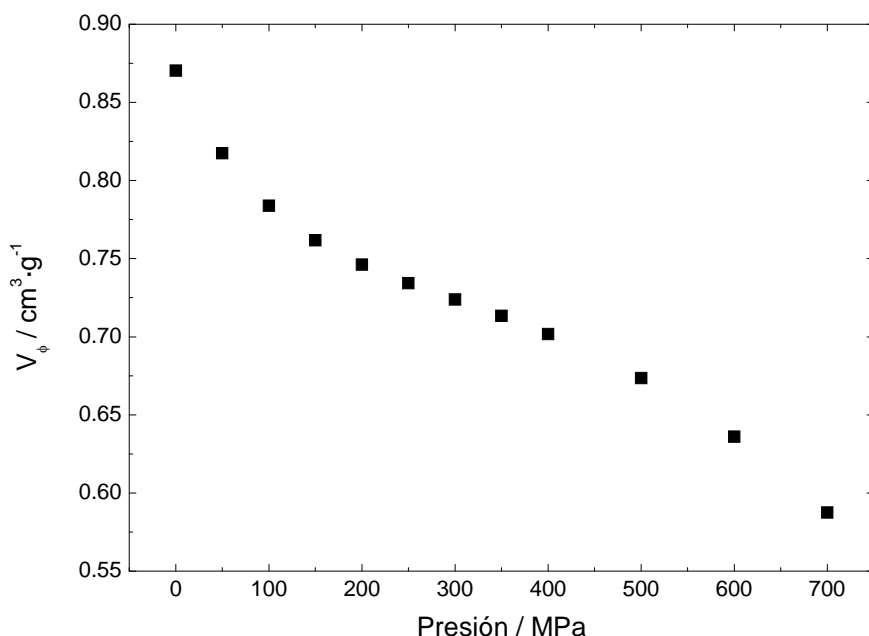
Haciendo uso de la Ecuación 7.3 se ha calculado el volumen específico aparente para el NaL a 298.15 K. Los resultados se muestran en la Figura 7.18. Se hicieron tres experimentos y en la Figura 7.18 se muestra el valor medio. Con el sistema experimental que se dispone, es difícil reproducir exactamente los mismos valores de presión y temperatura en dos ensayos diferentes, uno con agua y otro con la disolución de trabajo. Este hecho se debe a que tanto la regulación de la presión en el equipo de alta presión, como de la temperatura en el baño termostático, permiten una variación de 2 MPa y 0.05 K con respecto a los valores de presión y temperatura seleccionados, es decir que por ejemplo, si se está haciendo una medida para una presión nominal de 250 MPa y una temperatura de 298.15 K, la medida del agua se ha podido hacer, por ejemplo, a 250.7 MPa y 298.55 K y para la disolución a 249.8 MPa y 298.95 K. Hay que tener en cuenta que no es posible medir el disolvente puro y la disolución exactamente en las mismas condiciones de presión. Por ello, se siguió el siguiente procedimiento. Se ajustaron los resultados de velocidad del sonido a un polinomio de grado 8 (es habitual en la literatura describir el comportamiento de la velocidad del sonido en líquidos a alta presión por un polinomio). Con los valores de los parámetros, se calcularon las velocidades del sonido a las presiones de 0.1, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600 y 700 MPa exactamente tanto para el disolvente

como para la disolución de NaL. Posteriormente, se ajustó el volumen específico,  $V$ , tanto para el agua como para la disolución de NaL a la siguiente ecuación:

$$V(p) = A \left( 1 - \frac{p - 0.1}{B(p - 0.1)^2 + C(p - 0.1) + D} \right) \quad \text{Ecuación 7.11}$$

donde  $A$  es el volumen específico a presión atmosférica,  $p$  es la presión,  $B$  es,  $C$  es y  $D$  el módulo de compresibilidad secante a presión atmosférica. Con los valores de los parámetros se calculó el volumen específico en las presiones citadas anteriormente, de tal forma que todos los datos, tanto la velocidad del sonido como el volumen específico estuvieran exactamente a los mismos valores de presión.

En la Figura 7.18 se aprecia cómo a medida que aumenta la presión el volumen específico aparente disminuye, siendo hasta presiones de unos 200 MPa cuando se produce la mayor disminución. A presiones comprendidas entre 200 y 400 MPa el valor de  $V_\phi$  disminuye más lentamente, y finalmente para presiones superiores a 400 MPa se vuelve a producir una disminución importante de  $V_\phi$ . La variación en  $V_\phi$  que se produce en el intervalo de presiones estudiado es del 32 %. Se relaciona con la compresión de los volúmenes libres entre las cadenas hidrofóbicas del NaL en las micelas, los cambios en la hidratación del NaL, y la disociación de las micelas. Es necesaria la información de cómo varía la compresibilidad adiabática específica del NaL con la presión para poder interpretar ese comportamiento de forma más precisa.

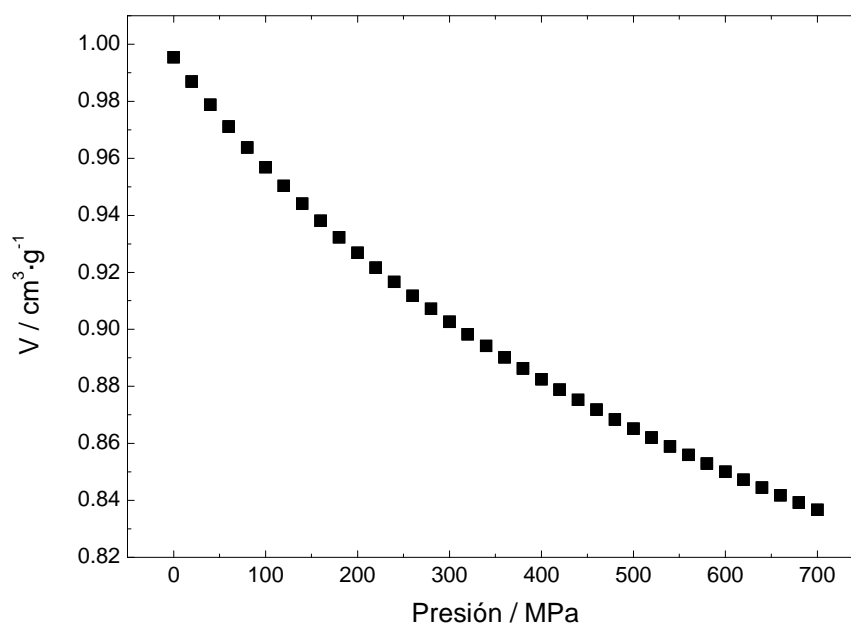


**Figura 7.18.** Variación del volumen específico aparente con la presión para una disolución de NaL de concentración  $0.0295 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$  a  $298.15 \text{ K}$ .

- **Caseinato de sodio**

Se ha determinado el volumen específico aparente para una disolución de NaCas de concentración 2.6 % p/p a 298.15 K y presiones comprendidas entre 0.1 y 700 MPa por triplicado.

Para determinar el volumen específico aparente es necesario conocer previamente el volumen específico, como se vio en la Ecuación 7.2. Como se puede ver en la ecuación, es necesario conocer el volumen específico del disolvente, es decir, el agua, en las mismas condiciones de presión y temperatura en las que se encuentran la disolución de NaCas. Por tanto, para evitar este inconveniente, se utilizó el mismo procedimiento descrito en el caso del NaL. Mediante el uso de este procedimiento se consigue tener los valores del agua y el NaCas bajo las mismas condiciones de presión a las que se sometieron las muestras de NaCas. En la Figura 7.19 se muestran los resultados obtenidos para estas medidas del volumen específico.

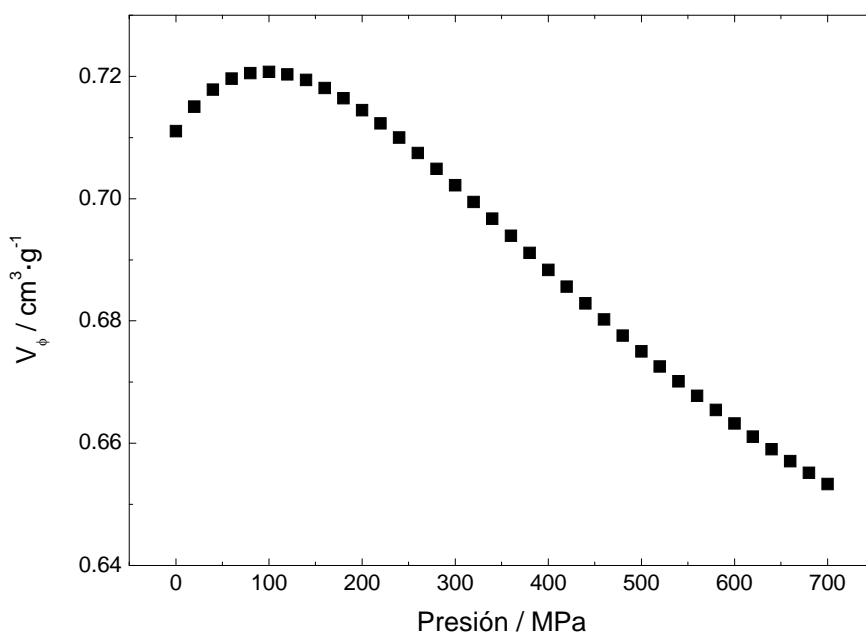


**Figura 7.19.** Variación del volumen específico con la presión para el agua y varias disoluciones de NaCas a 298.15 K con diferentes incrementos de presión.

El volumen específico desciende a medida que aumenta la presión, como es de esperar debido a la reducción de los espacios intermoleculares por la compresión. La tendencia que sigue el volumen específico con la presión para el NaCas es paralela a la del agua. Los valores del volumen específico que presentan las disoluciones de NaCas son un poco menores que los del agua, del orden de  $0.008 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ . Este hecho se debe a que el NaCas tiene un peso molecular mayor que el agua.

Una vez que se ha determinado el volumen específico del disolvente puro y las disoluciones del NaCas bajo las mismas condiciones de presión, se hace uso de la Ecuación 7.2 para la determinación del volumen específico aparente,  $V_\phi$ . En la Figura 7.20 se muestran los resultados para los experimentos llevados a cabo.

La tendencia que sigue  $V_\phi$  a presiones bajas está relacionada con la compresibilidad adiabática aparente negativa del caseinato de sodio en disolución a presión atmosférica. El valor negativo de  $\kappa_{s\phi}$  traduce que la contribución del agua de la capa de hidratación del NaCas es mayor que la de los huecos debidos al ordenamiento imperfecto de las caseínas en el agregado, y ese balance se mantiene a presiones por debajo de 100 MPa. A partir de 100 MPa vemos cómo  $V_\phi$  disminuye de forma continua y prácticamente lineal hasta la presión más alta estudiada. Esta disminución ya se debe principalmente a la compresión de los volúmenes libres entre las proteínas agregadas, y en menor medida a cambios en la hidratación y/o a la reorganización de las proteínas en los agregados.



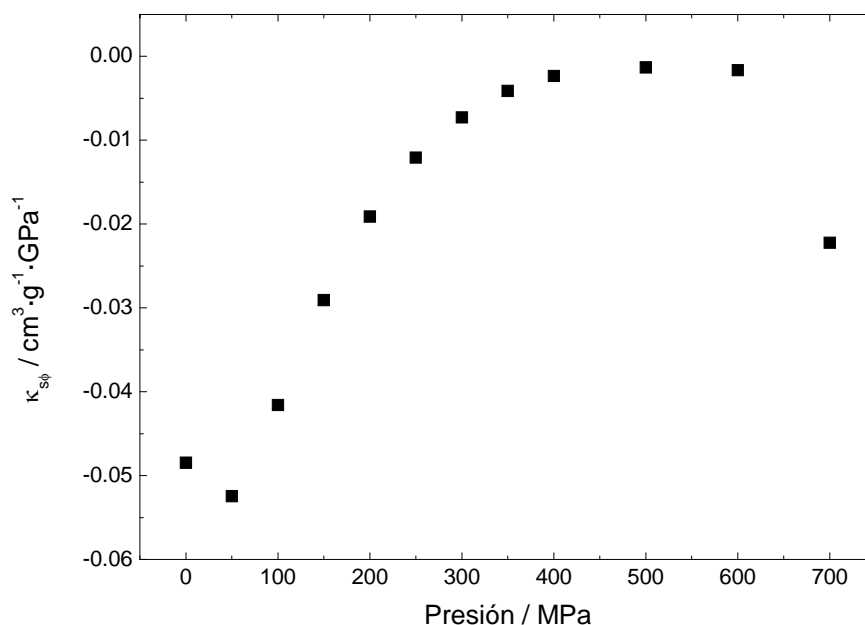
**Figura 7.20.** Variación del volumen específico aparente,  $V_\phi$  con la presión para varios experimentos con diferentes incrementos de presión para una disolución de NaCas de concentración 2.6 % p/p a 298.15 K.

### 7.3.2.2 Determinación de la compresibilidad adiabática aparente

- **Dodecanoato de sodio**

Para determinar la compresibilidad adiabática aparente,  $\kappa_{s\phi}$  de la disolución de NaL 0.0295 mol·kg<sup>-1</sup> a 298.15 K en función de la presión se utilizó la Ecuación 7.7. En la Figura 7.21 se muestran los resultados para  $\kappa_{s\phi}$  en función de la presión. Se observa

cómo  $\kappa_{s\phi}$  aumenta hasta una presión de unos 400 MPa. Después parece que  $\kappa_{s\phi}$  se mantiene constante a presiones comprendidas entre 400 y 600 MPa. El último valor de  $\kappa_{s\phi}$  a 700 MPa tiene una incertidumbre experimental mayor por lo que no se puede concluir sobre la posible disminución de  $\kappa_{s\phi}$  a esta presión.



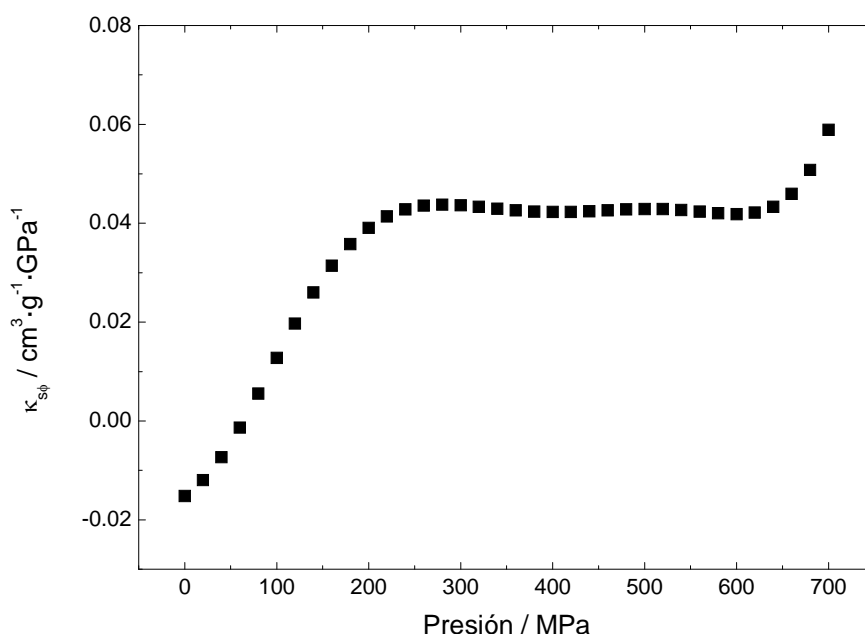
**Figura 7.21.** Variación de la compresibilidad adiabática aparente,  $\kappa_{s\phi}$ , para una disolución de NaL de concentración  $0.0295 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$  a  $298.15 \text{ K}$ .

- **Caseinato se sodio**

Como se vio en el Capítulo 6, en el que se estudió mediante medidas de velocidad del sonido la agregación del NaCas, existe una alta reproducibilidad en las medidas de velocidad del sonido, con una desviación estándar comprendida entre  $\pm 0.6$  y  $\pm 1.8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  según las presiones consideradas. Al igual que en la determinación del volumen específico, es necesario medir la velocidad del sonido tanto del disolvente puro como de las disoluciones de NaCas. Ya se comentó en el apartado dedicado al cálculo del volumen específico aparente la dificultad que existe al no ser posible medir la velocidad del sonido en las mismas condiciones de presión y temperatura para las dos sustancias involucradas en el sistema, es decir, el agua y el NaCas. Por ello, se siguió el protocolo descrito para tener los valores velocidad del sonido y volumen específico bajo las mismas condiciones de presión, utilizando un polinomio de grado 8 y la Ecuación 7.9, respectivamente.

En la Figura 7.22 se muestra la variación de la compresibilidad adiabática aparente para una disolución del NaCas al 2.6 % p/p a  $298.15 \text{ K}$ . Podemos ver cómo  $\kappa_{s\phi}$

aumenta de forma notable hasta presiones de unos 260 MPa y para presiones comprendidas entre 260 y 640 MPa ésta se mantiene constante para aumentar nuevamente hasta la presión más alta estudiada. Hay que tener en cuenta que a presiones elevadas existe mayor error experimental, por lo que este último aumento a presiones superiores a 640 MPa hay que tomarlo con cierta cautela. La variación que se produce en  $\kappa_{s\phi}$  en el intervalo de presiones estudiado es aproximadamente de un orden de magnitud.



**Figura 7.22.** Variación de la compresibilidad adiabática aparente,  $\kappa_{s\phi}$ , para una disolución de NaCas al 2.6 % p/p a 298.15 K.

El comportamiento de  $\kappa_{s\phi}$  con la presión es complejo. Se sabe que la hidratación de las moléculas decrece cuando se incrementa la presión,<sup>iError! Marcador no definido.</sup> es decir, la proteína aumenta su hidrofobicidad, lo que provoca un descenso de la hidratación y un aumento en el volumen de los huecos. Ambos efectos llevan a un aumento del valor de la compresibilidad adiabática aparente. Esta observación coincide con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, al menos hasta 180 - 200 MPa. El hecho de que se mantenga constante posteriormente la compresibilidad adiabática aparente podría relacionarse con la reorganización de las micelas de caseína en agregados de tamaño menor, como se observó en el caso de muestras de leche.<sup>31,32</sup>

## 7.4 Resumen y conclusiones

- Se han estudiado a presión atmosférica y en función de la concentración y la temperatura el NaL y el NaCas. Para el NaL se observa una diferencia de comportamiento tanto en  $V_\phi$  como en  $\kappa_{s\phi}$  entre la región premicelar y postmicelar. Para el NaCas la variación con la concentración en  $V_\phi$  y en  $\kappa_{s\phi}$  es muy pequeña, no así con la concentración para la concentración fija de 2.6 % p/p.
- Se han estudiado  $V_\phi$  y  $\kappa_{s\phi}$  para una concentración fija de NaL y NaCas en función de la presión a 298.15 K. Los resultados muestran que  $V_\phi$  disminuye en todo el intervalo de concentración estudiado para el NaL, y si obviamos el error experimental en las medidas del NaCas a presiones bajas, podemos afirmar que ocurre lo mismo. En cuanto a  $\kappa_{s\phi}$  el comportamiento vuelve a ser similar para ambas sustancias, un aumento de  $\kappa_{s\phi}$  tras el que se produce una estabilización, pero las presiones hasta las que se produce el aumento y el intervalo en el que  $\kappa_{s\phi}$  se mantiene constante no son las mismas para ambas sustancias.

## 7.5 Referencias

- <sup>1</sup> Huang H., Verrall R. E.; *Can. J. Chem.* **1997**, 75, 1445-1462.
- <sup>2</sup> Attwood D., Blunder R., Mosquera V., Garcia M., Rodriguez J.; *Colloid and Polymer Science.* **1994**, 272, 108-114.
- <sup>3</sup> Wen X. G., Verrall R. E.; *J. Coll. Int. Science.* **1997**, 196, 215-223
- <sup>4</sup> Sommer C., Pedersen J. S., Stein P. C.; *J. Phys. Chem. B.* **2004**, 108, 6242-6249.
- <sup>5</sup> Chalikian T. V.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2003**, 32, 207-235.
- <sup>6</sup> Kauzmann W.; *Advances in Protein Chemistry.* **1959**, 14, 1-63.
- <sup>7</sup> Gekko K., Mugishima H., Koga S.; *Int. J. Biological Macromolecules.* **1985**, 7, 57-63.
- <sup>8</sup> Chalikian T. V., Sarvazyan A. P., Funck T., Cain C. A., Breslauer K. J.; *J. Phys.Chem.* **1994**, 98, 321-328.
- <sup>9</sup> Parke S. A., Birch G. G.; *J. Agricultural Food Chem.* **1999**, 47, 1378-1384.
- <sup>10</sup> Vikingstad E., Skauge A., Hoiland H.; *J. Colloid. Interface Sci.* **1979**, 72, 59-67.
- <sup>11</sup> Kaneshina S., Tanaka M., Tomida T.; *J. Colloid Interface Sci.* **1974**, 48, 450.



- <sup>12</sup> Musbally G. M., Perron G., Desnoyers J.E.; *J. Colloid Interface Sci.* **1976**, 54, 80.
- <sup>13</sup> Sakurai M.. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1973**, 46, 1596.
- <sup>14</sup> Gekko K., Hasegawa Y.; *J. Phys. Chem.* **1989**, 25, 6563-6571.
- <sup>15</sup> Hustinx J. C. A., Singh T. K., Fox P. F.; *International Dairy Journal.* **1997**, 7, 207-212.
- <sup>16</sup> Dagleish D. G., Law A. J. R.; *Journal of Dairy Technology.* **1988**, 41, 1-4.
- <sup>17</sup> Singh H.; *International Dairy Federation.* **1995**, 9501, 86-104.
- <sup>18</sup> Guo M., Fox P. F., Flynn A., Mohammad K. S.; *Journal of Dairy Research.* **1989**, 56, 503-512.
- <sup>19</sup> Pitkowski A., Durand D., Nicolai N.; *Journal of Colloid and Interface Science.* 2008, 326, 96-102.
- <sup>20</sup> Aschi A., Calmettes P., Daoud M., Doiullard R., Gharbi A.; *Polymer.* **2009**, 50, 6024-6031.
- <sup>21</sup> Fahey P. F., Kupke S. W., Beams J. W.; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* **1969**, 63, 2, 548-555.
- <sup>22</sup> Seemann H., Winter R., Royer C. A.; *J. Mol. Biol.* **2001**, 307, 1091-1102.
- <sup>23</sup> Gekko K., Araga M., Kamiyama T., Ohmae E., Akasaka K.; *Biophys. Chem.* **2009**, 144, 67-71.
- <sup>24</sup> Hedwig G. R., Høgseth E., Høiland H.; *Physical Chemistry Chemical Physics.* **2008**, 10, 884-897.
- <sup>25</sup> Brun T. S., Hoiland H., Vikingstad E.; *J. Coll. Int. Science* **1978**, 64, 126-130.
- <sup>26</sup> De Lisi R., Inglese A., Milioto S., Pellerito A.; *J. Coll. Int. Science.* **1996**, 180, 174-187.
- <sup>27</sup> Huang H., Verrall R. E.; *Can. J. Chem.* **1997**, 75, 1445-1462.
- <sup>28</sup> Blanco E., González-Pérez A., Ruso J. M., Pedrido R., Prieto G., Sarmiento F.; *J. Coll. Int. Science* **2005**, 288, 247-260.
- <sup>29</sup> McMeekin T. L., Groves M. L., Hipp N. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 3298-3330.
- <sup>30</sup> Portnaya I., Cogan U., Livney Y. D., Ramon O., Shimoni K., Rosenberg M., Danino D.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2006**, 54, 5555-5561.
- <sup>31</sup> Huppertz T., De Kruif C.G., Kelly A.L.; *Journal of Dairy Research.* **2006**, 73, 294-298.
- <sup>32</sup> Knudsen J. C., Skibsted L. H.; *Food Chemistry.* **2010**, 119, 202-208.

# ***CAPÍTULO 8***

## ***CONCLUSIONES***

---

El objetivo general de esta Tesis Doctoral consistía en dilucidar el papel que puede jugar el agua en la formación y estabilidad de agregados supramoleculares en un entorno acuoso. Por otra parte, los diferentes objetivos específicos se han concretado a lo largo de los Capítulos 4 al 7 y al final de cada uno de ellos se han resumido las conclusiones pertinentes a cada sistema. Por ello, en este capítulo final de Conclusiones queremos evitar caer en la tentación de repetir y/o resumir las conclusiones parciales y, en su lugar, trataremos de proporcionar una discusión integradora basándonos en dichas conclusiones, refiriendo al lector al final de cada capítulo para su consulta. Opinamos que esta es la forma pertinente de responder a la pregunta planteada implícitamente en el Título de la Memoria; esto es llegar a determinar si los cambios observados en sistemas acuosos supramoleculares pueden atribuirse a las diversas anomalías que presentan las propiedades termodinámicas del agua, tanto en función de la presión como de la temperatura.

Los resultados del Capítulo 4 avalan la metodología y las técnicas experimentales elegidas en este trabajo, dado que hemos sido capaces de definir con una alta precisión la transición estructural LDW-HDW (agua de baja densidad-agua de alta densidad). Es más hemos encontrado desviaciones sistemáticas respecto a la

ecuación IAPWS-95 que es la que se utiliza como referencia a nivel mundial. Cabe destacar que los resultados proporcionados en esta Tesis Doctoral corresponden a la zona del diagrama de fases del agua más importante en el área de la conservación de alimentos, esto es, en las inmediaciones de las transiciones de fase líquido-sólido agua-hielo Ih y agua-hielo VI. Adicionalmente, nuestros resultados indican que las transiciones de fase agua-hielo III y agua-hielo V, que aparecen en la misma región del diagrama de fases presión-temperatura, podrían estar tan bien definidas como defienden otros autores. Pensamos que la dificultad en llevar a cabo medidas precisas en esas condiciones de presión y temperatura –posiblemente debidas a fenómenos cinéticos y a su sensibilidad a la presencia de impurezas– determina la ausencia de medidas precisas suficientes como para definir con exactitud las líneas de equilibrio en esta región del diagrama de fases.

Quizás la propiedad más característica y discutida en los fenómenos de agregación supramolecular es la concentración micelar crítica (CMC), estudio que hemos abordado en el Capítulo 5 con el análisis de un sistema modelo, como es el NaL. Dicho análisis nos ha permitido validar nuestra metodología para la determinación de la CMC a presión atmosférica en función de la temperatura mediante las medidas de velocidad del sonido a 298.15 K. Posteriormente se ha empleado esta metodología para hacer un estudio de cómo varía la CMC en función con la temperatura desde 283.15 a 333.15 K. Todo este conjunto de medidas era necesario para poder abordar el estudio de las propiedades aparentes en el Capítulo 7. Sin embargo, los resultados más novedosos aportados en este trabajo corresponden al estudio de la variación con la presión de la CMC del NaL a temperatura ambiente. Nuestras medidas coinciden dentro de la incertidumbre estimada con resultados previos de la literatura, validando así nuestra metodología, pero además hemos encontrado a mayores presiones una nueva fase más densa que hemos denominado fase sólida hidratada, de acuerdo con la denominación aceptada para otros surfactantes. Cabe destacar la metodología utilizada para determinar estos cambios de estado. Por una parte, se requieren resultados de velocidad del sonido de altísima precisión, pues los valores en disolución apenas difieren de los observados en el agua a las mismas condiciones de presión y temperatura. Y por otro lado, ha sido necesario llevar a cabo un exhaustivo e intensivo análisis numérico de los resultados, puesto que las transiciones detectadas vienen definidas por cambios sutiles en las derivadas de la velocidad del sonido en función de la presión. Podemos concluir entonces que, si bien la velocidad del sonido es sensible a los cambios provocados por la formación de diferentes fases supramoleculares en el seno de la disolución, su aplicación exige disponer de técnicas de altísima precisión,

como las empleadas en este trabajo, y asegurar su reproducibilidad mediante un número elevado de medidas independientes.

En el Capítulo 6 hemos abordado el estudio de un compuesto de referencia para las caseínas de la leche, el NaCas, y las caseínas propiamente dichas, provenientes de la leche desnatada pasteurizada (LDP). Estos sistemas no presentan valores de CMC definidas como en el caso del NaL, aunque la primera derivada de la velocidad del sonido muestra un cambio de pendiente en torno a una presión de 300 MPa. El hecho de que este cambio de pendiente ocurra en el mismo intervalo de presión que la transición LDW-HDW lleva a pensar que los cambios observados en la disolución no deben atribuirse al proceso de agregación, que hemos demostrado que es progresivo, sino al cambio estructural asociado al agua. Esta es quizás una de las conclusiones más relevantes de nuestro trabajo, dado que en la literatura se han discutido posibles cambios en las estructuras de los agregados de caseína y proteínas similares, basándose en los cambios observados en medidas de velocidad del sonido u otras propiedades.

La discusión de los resultados del Capítulo 6 justifica el análisis pormenorizado de las propiedades aparentes al que se dedica el Capítulo 7 de la Tesis Doctoral, en donde hemos confirmado que los cambios con la temperatura en las propiedades aparentes también ocurren a las temperaturas donde se han encontrado anomalías en el comportamiento termodinámico del agua líquida, confirmando así la línea de investigación por la transcurre esta Tesis Doctoral y que esperamos sirva de guía para futuros estudios de sistemas acuosos tanto a nivel fundamental como aplicado.



# ***APÉNDICE I***

## ***DATOS DE VELOCIDAD DEL SONIDO DEL AGUA***

---

En este apéndice se detallan los valores de velocidad del sonido en función de la presión del agua para las series de experimentos llevados a cabo para cada isoterma. Los valores de estas medidas han sido utilizados en el Capítulo 4 para determinar la transición entre el agua de baja densidad, *LDW*, y el agua de alta densidad, *HDW*. Algunos de los valores para las isothermas por debajo de 273.15 K se han marcado en cursiva para indicar que se producía un efecto que se ha explicado en el apartado 4.3.4 del Capítulo 4.

En la Tabla que se presenta a continuación,  $p$  representa la presión,  $T$  la temperatura,  $u_s$  la velocidad del sonido y  $u_s (u_c)$  la incertidumbre en la velocidad del sonido.

T = 253.15 K							
p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$
198.9	252.57	1683.1	2.5	225.0	252.55	1736.1	2.6
205.2	252.50	1695.9	2.5	230.0	252.53	1745.4	2.6
210.1	252.52	1705.8	2.6	235.2	252.54	1755.1	2.7
215.3	252.53	1716.3	2.6	239.2	252.54	1762.7	2.7
220.3	252.61	1726.3	2.6	245.0	252.54	1774.1	2.7
225.1	252.59	1735.8	2.6	199.4	252.57	1684.1	2.5
230.0	252.53	1745.0	2.6	204.9	252.56	1695.4	2.5
235.1	252.51	1754.9	2.7	209.9	252.50	1705.2	2.6
240.0	252.50	1764.3	2.7	215.1	252.47	1715.3	2.6
244.9	252.52	1773.9	2.7	220.0	252.47	1725.1	2.6
200.1	252.53	1685.4	2.5	225.1	252.53	1735.1	2.6
204.8	252.53	1695.3	2.5	229.9	252.57	1744.6	2.6
210.1	252.52	1706.0	2.6	235.2	252.57	1754.8	2.7
215.3	252.50	1716.8	2.6	240.1	252.53	1764.5	2.7
220.2	252.51	1726.7	2.6	245.4	252.51	1774.8	2.7
T = 258.15 K							
p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$
170.0	257.66	1644.4	2.4	309.8	257.68	1907.4	3.0
176.2	257.70	1657.4	2.4	314.9	257.59	1916.2	3.0
179.8	257.68	1665.2	2.4	320.4	257.68	1924.7	3.0
185.2	257.66	1676.9	2.5	325.0	257.70	1928.5	3.0
190.1	257.65	1686.8	2.5	332.4	257.73	1928.5	3.0
194.9	257.66	1695.8	2.5	336.1	257.73	1928.3	3.0
199.9	257.66	1705.5	2.5	342.3	257.68	1928.0	3.0
205.2	257.67	1716.0	2.5	347.2	257.67	1927.9	3.0
210.0	257.65	1725.8	2.6	352.8	257.64	1927.7	3.0
215.2	257.62	1735.7	2.6	175.1	257.60	1654.5	2.4
220.3	257.63	1745.5	2.6	199.6	257.69	1704.5	2.5
225.3	257.59	1755.0	2.6	224.6	257.70	1754.0	2.6
230.0	257.58	1764.0	2.7	249.5	257.69	1800.5	2.7
235.3	257.64	1774.3	2.7	276.1	257.65	1848.6	2.8
240.0	257.61	1783.0	2.7	299.7	257.67	1889.4	2.9
245.3	257.66	1792.5	2.7	325.4	257.68	1932.5	3.0
250.2	257.64	1801.3	2.7	349.3	257.69	1972.1	3.1
255.0	257.60	1810.0	2.8	375.3	257.68	2012.5	3.2
260.3	257.57	1819.8	2.8	176.4	257.69	1657.4	2.4
265.3	257.59	1829.6	2.8	199.5	257.61	1703.9	2.5
270.1	257.59	1838.6	2.8	224.1	257.65	1752.6	2.6
275.2	257.61	1847.7	2.8	249.4	257.67	1799.8	2.7
280.0	257.61	1856.1	2.8	274.4	257.62	1845.4	2.8
284.3	257.64	1863.4	2.9	299.9	257.66	1889.6	2.9

p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$
289.8	257.63	1872.8	2.9	325.4	257.70	1932.5	3.0
294.1	257.63	1880.2	2.9	350.0	257.69	1972.9	3.1
300.2	257.67	1890.9	2.9	374.6	257.67	2011.2	3.2
304.8	257.68	1899.0	2.9				

T = 263.15 K

p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$
119.9	262.75	1565.7	2.2	419.3	262.78	2089.8	3.3
130.5	262.66	1588.2	2.2	433.7	262.80	2089.4	3.3
140.6	262.59	1608.5	2.3	124.1	262.74	1574.1	2.2
150.7	262.76	1629.8	2.3	148.4	262.76	1623.4	2.3
160.7	262.73	1650.3	2.4	174.8	262.77	1677.2	2.4
170.8	262.80	1670.8	2.4	199.8	262.74	1725.4	2.5
180.8	262.77	1690.3	2.5	224.6	262.76	1772.3	2.6
190.8	262.76	1709.2	2.5	251.0	262.76	1819.5	2.7
200.8	262.81	1728.7	2.5	274.6	262.72	1861.2	2.8
210.8	262.70	1746.8	2.6	299.4	262.73	1903.1	2.9
220.8	262.71	1765.7	2.6	324.6	262.73	1945.1	3.0
230.6	262.70	1784.0	2.7	349.6	262.73	1984.2	3.1
240.8	262.71	1802.0	2.7	374.3	262.72	2023.2	3.2
250.6	262.68	1820.4	2.7	399.9	262.71	2060.0	3.2
260.8	262.71	1839.4	2.8	425.6	262.74	2097.8	3.3
270.7	262.69	1856.2	2.8	450.5	262.74	2133.0	3.4
280.8	262.73	1873.2	2.9	126.3	262.77	1578.6	2.2
290.6	262.67	1890.3	2.9	149.8	262.81	1626.1	2.3
299.8	262.63	1906.0	2.9	174.8	262.77	1676.9	2.4
310.5	262.67	1923.6	3.0	199.8	262.76	1724.8	2.5
320.4	262.74	1939.8	3.0	224.8	262.65	1771.8	2.6
330.6	262.77	1956.2	3.0	249.7	262.73	1816.5	2.7
340.4	262.77	1971.2	3.1	274.5	262.75	1860.6	2.8
350.6	262.76	1986.4	3.1	299.6	262.74	1903.2	2.9
359.4	262.81	2000.0	3.1	324.5	262.71	1944.4	3.0
369.6	262.68	2016.0	3.2	349.4	262.71	1982.7	3.1
379.2	262.75	2031.4	3.2	375.1	262.76	2023.0	3.2
389.5	262.79	2046.7	3.2	399.3	262.76	2058.1	3.2
399.7	262.78	2061.2	3.2	424.3	262.72	2095.3	3.3
409.2	262.81	2075.4	3.3	449.4	262.74	2130.8	3.4

T = 268.15 K

p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$
70.9	267.76	1496.1	2.0	493.3	267.85	2167.6	3.5
80.3	267.81	1514.9	2.0	499.5	267.86	2167.5	3.5
90.3	267.82	1534.7	2.1	510.0	267.84	2167.2	3.5
100.5	267.84	1554.9	2.1	520.1	267.84	2167.1	3.5



p MPa	T K	$u_s$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$u_c(u_s)$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$u_c(u_s)$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
110.5	267.85	1573.8	2.2	74.1	267.91	1502.8	2.0
120.3	267.86	1593.5	2.2	98.5	267.81	1551.2	2.1
130.5	267.86	1612.8	2.3	124.4	267.82	1601.5	2.2
140.5	267.87	1632.5	2.3	149.6	267.79	1649.8	2.3
150.8	267.88	1652.5	2.3	174.5	267.84	1697.5	2.4
160.7	267.89	1672.0	2.4	199.5	267.84	1744.6	2.5
169.8	267.88	1689.0	2.4	224.4	267.86	1790.0	2.6
179.9	267.89	1708.4	2.5	251.1	267.87	1837.5	2.8
189.7	267.89	1727.2	2.5	274.6	267.83	1877.2	2.8
199.9	267.89	1745.2	2.5	299.4	267.85	1918.6	2.9
209.7	267.86	1763.2	2.6	325.1	267.86	1960.2	3.0
219.6	267.88	1781.3	2.6	349.7	267.87	1997.5	3.1
229.5	267.87	1798.4	2.7	375.0	267.86	2036.3	3.2
239.6	267.88	1816.4	2.7	399.7	267.86	2071.2	3.2
249.6	267.87	1835.0	2.7	424.3	267.85	2107.4	3.3
259.7	267.87	1852.1	2.8	450.7	267.84	2144.1	3.4
269.6	267.88	1868.4	2.8	473.7	267.85	2175.9	3.5
279.6	267.86	1885.7	2.9	500.1	267.84	2209.7	3.5
289.4	267.85	1902.6	2.9	523.8	267.85	2241.7	3.6
299.6	267.88	1919.3	2.9	76.1	267.77	1505.8	2.0
309.8	267.91	1935.5	3.0	100.8	267.78	1554.9	2.1
318.9	267.85	1949.6	3.0	124.8	267.79	1601.5	2.2
329.4	267.86	1966.0	3.0	149.6	267.79	1648.8	2.3
339.5	267.85	1981.2	3.1	174.8	267.76	1697.5	2.4
349.5	267.88	1996.1	3.1	199.5	267.77	1744.1	2.5
359.6	267.86	2012.2	3.1	224.6	267.81	1790.0	2.6
368.6	267.85	2026.3	3.2	249.4	267.80	1833.6	2.7
379.9	267.87	2043.0	3.2	274.4	267.79	1876.0	2.8
390.1	267.85	2057.4	3.2	300.4	267.78	1918.4	2.9
400.0	267.82	2071.6	3.2	324.7	267.78	1958.6	3.0
409.8	267.84	2086.2	3.3	349.7	267.78	1997.2	3.1
419.4	267.83	2100.3	3.3	374.9	267.80	2036.2	3.2
431.1	267.83	2117.3	3.3	399.6	267.79	2070.9	3.2
438.8	267.84	2127.9	3.4	425.1	267.79	2108.1	3.3
449.2	267.87	2142.4	3.4	449.3	267.80	2141.5	3.4
459.2	267.84	2156.4	3.4	474.8	267.79	2176.3	3.5
469.4	267.86	2168.4	3.4	500.4	267.79	2208.8	3.5
483.5	267.83	2167.9	3.5	526.4	267.82	2243.7	3.6

T = 273.15 K

p MPa	T K	$u_s$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$u_c(u_s)$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$u_c(u_s)$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
0.1	273.05	1399.3	1.7	230.5	273.12	1815.4	2.6
49.3	273.01	1483.9	1.7	240.5	273.14	1832.2	2.6
99.8	273.18	1577.5	2.1	250.6	273.11	1848.7	2.7

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
150.2	273.13	1672.1	2.3	260.4	273.09	1864.5	2.7
200.5	273.02	1762.6	2.5	271.0	273.07	1882.6	2.7
250.7	273.10	1849.0	2.7	280.9	273.12	1899.6	2.8
300.0	273.12	1929.7	2.8	290.6	273.09	1915.4	2.8
349.7	273.13	2007.0	3.0	300.6	273.08	1930.8	2.8
401.0	273.12	2081.2	3.1	310.6	273.09	1946.3	2.9
450.2	273.12	2149.8	3.3	320.4	273.10	1962.0	2.9
500.4	273.10	2215.2	3.4	329.6	273.09	1976.3	2.9
550.2	273.11	2281.4	3.5	340.3	273.10	1993.1	3.0
599.5	273.12	2342.0	3.7	350.4	273.10	2009.0	3.0
0.1	273.09	1399.8	1.7	359.3	273.05	2022.6	3.0
49.2	273.07	1484.0	1.7	369.6	273.07	2037.3	3.0
100.0	273.09	1578.3	2.1	380.1	273.08	2051.7	3.1
150.2	273.09	1671.7	2.3	390.3	273.08	2066.3	3.1
200.3	273.11	1762.7	2.5	399.7	273.08	2080.1	3.1
250.3	273.11	1848.4	2.7	409.8	273.13	2094.6	3.2
299.9	273.11	1929.5	2.8	419.4	273.11	2107.8	3.2
349.4	273.09	2006.9	3.0	429.4	273.12	2121.6	3.2
399.6	273.12	2079.5	3.1	439.2	273.12	2135.1	3.2
450.5	273.10	2150.3	3.3	449.3	273.12	2149.5	3.3
499.9	273.13	2214.6	3.4	460.9	273.11	2166.3	3.3
550.5	273.10	2281.3	3.5	469.7	273.11	2178.3	3.3
602.1	273.10	2345.3	3.7	479.6	273.12	2190.8	3.4
0.1	273.10	1398.7	1.7	489.3	273.10	2202.5	3.4
9.8	273.06	1416.1	1.7	499.8	273.07	2214.4	3.4
19.9	273.07	1432.6	1.8	509.5	273.07	2227.3	3.4
30.1	273.05	1450.4	1.8	520.7	273.08	2241.8	3.5
40.3	273.09	1467.6	1.8	529.9	273.08	2254.1	3.5
50.3	273.03	1485.7	1.8	539.3	273.07	2268.3	3.5
60.4	273.04	1503.6	1.9	550.3	273.12	2276.8	3.5
70.2	273.02	1522.5	1.9	561.2	273.10	2285.8	3.6
80.5	273.04	1542.1	2.0	571.9	273.11	2294.1	3.6
90.4	273.05	1560.4	2.0	579.7	273.10	2301.6	3.6
100.5	273.10	1579.6	2.1	591.1	273.09	2310.8	3.6
110.4	273.10	1598.6	2.1	601.5	273.09	2316.0	3.6
120.4	273.10	1617.1	2.1	609.8	273.04	2322.9	3.7
130.6	273.10	1636.2	2.2	623.7	273.08	2328.0	3.7
140.7	273.10	1653.9	2.2	636.2	273.07	2331.6	3.7
150.4	273.09	1671.6	2.3	646.9	273.07	2334.3	3.7
160.6	273.09	1690.2	2.3	657.6	273.09	2337.3	3.7
170.8	273.08	1709.3	2.3	668.3	273.09	2339.4	3.7
180.4	273.09	1727.4	2.4	679.2	273.09	2341.6	3.7
190.4	273.08	1744.7	2.4	688.9	273.10	2343.4	3.8
200.7	273.08	1763.5	2.5	698.6	273.05	2344.9	3.8
210.9	273.10	1782.0	2.5	710.4	273.06	2346.9	3.8

p MPa	T K	$u_s$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$u_c(u_s)$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$u_c(u_s)$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
220.7	273.11	1798.7	2.5				
T = 278.15 K							
p MPa	T K	$u_s$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$u_c(u_s)$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$u_c(u_s)$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
0.1	278.24	1425.6	1.8	539.5	278.07	2271.0	3.5
20.9	278.18	1460.7	1.8	561.5	278.11	2297.2	3.6
50.6	278.21	1510.2	1.8	579.7	278.04	2320.9	3.6
80.8	278.22	1563.8	2.0	602.1	278.08	2346.8	3.7
109.2	278.19	1614.9	2.1	621.5	278.17	2369.6	3.7
139.3	278.22	1669.4	2.2	640.2	278.11	2390.8	3.8
159.9	278.19	1705.3	2.3	662.0	278.11	2413.7	3.8
170.6	278.17	1724.5	2.4	680.5	278.08	2428.8	3.9
180.6	278.19	1741.4	2.4	700.2	278.09	2439.8	3.9
190.7	278.18	1759.2	2.4	0.1	278.15	1424.8	1.8
200.8	278.12	1777.1	2.5	48.3	278.13	1506.0	1.8
210.8	278.16	1793.2	2.5	99.6	278.15	1597.6	2.1
220.8	278.12	1809.8	2.6	150.1	278.13	1688.3	2.3
230.7	278.17	1827.0	2.6	200.3	278.08	1775.7	2.5
240.7	278.09	1843.6	2.6	250.2	278.12	1858.4	2.7
250.6	278.13	1859.7	2.7	299.9	278.10	1938.9	2.8
260.6	278.12	1876.2	2.7	349.6	278.08	2014.7	3.0
271.0	278.11	1893.4	2.7	400.0	278.09	2087.5	3.1
280.9	278.09	1909.5	2.8	450.9	278.08	2156.9	3.3
290.6	278.15	1924.6	2.8	500.3	278.05	2220.9	3.4
300.5	278.16	1940.0	2.8	550.6	278.13	2284.7	3.5
309.9	278.09	1954.2	2.9	599.3	278.17	2344.6	3.7
320.4	278.09	1970.1	2.9	651.9	278.17	2402.7	3.8
330.4	278.08	1984.9	2.9	701.3	278.17	2451.0	3.9
340.8	278.11	2000.9	3.0	0.1	278.05	1425.1	1.8
349.3	278.07	2013.6	3.0	49.2	278.09	1507.3	1.8
360.7	278.06	2030.3	3.0	99.9	278.16	1599.9	2.1
370.4	278.08	2043.7	3.1	150.1	278.14	1689.2	2.3
380.4	278.10	2057.5	3.1	200.1	278.13	1776.7	2.5
389.7	278.11	2071.5	3.1	250.1	278.13	1859.7	2.7
400.0	278.08	2086.4	3.1	299.9	278.12	1939.6	2.8
410.1	278.09	2100.2	3.2	349.8	278.17	2017.6	3.0
419.5	278.04	2113.0	3.2	400.5	278.10	2089.8	3.2
429.6	278.09	2126.7	3.2	450.8	278.12	2157.8	3.3
439.4	278.09	2140.5	3.3	500.4	278.10	2223.3	3.4
449.7	278.09	2155.5	3.3	550.8	278.09	2286.8	3.6
459.3	278.04	2169.2	3.3	600.7	278.12	2347.6	3.7
480.3	278.10	2196.3	3.4	650.0	278.12	2402.2	3.8
500.5	278.09	2221.3	3.4	700.6	278.19	2446.5	3.9
520.2	278.10	2247.0	3.5				

T = 288.15 K							
p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$
0.1	288.11	1461.4	1.8	480.0	288.09	2200.3	3.4
20.8	288.12	1499.9	1.9	499.8	288.15	2225.2	3.4
50.8	288.08	1549.6	1.8	521.4	288.19	2250.5	3.5
81.0	288.09	1599.1	2.1	541.5	288.16	2275.4	3.5
110.9	288.09	1650.2	2.2	561.3	288.17	2300.1	3.6
139.3	288.12	1698.6	2.3	581.2	288.14	2323.3	3.6
160.1	288.09	1733.4	2.4	599.9	288.11	2344.8	3.7
170.8	288.10	1751.7	2.4	622.1	288.18	2369.8	3.7
180.6	288.09	1767.9	2.4	640.7	288.17	2391.2	3.8
190.6	288.06	1783.4	2.5	660.3	288.14	2413.4	3.8
200.8	288.11	1799.7	2.5	682.1	288.18	2436.4	3.9
210.8	288.15	1816.4	2.6	700.8	288.11	2455.2	3.9
220.9	288.14	1832.2	2.6	0.1	288.08	1463.4	1.7
230.9	288.16	1847.1	2.6	50.9	288.09	1549.8	1.8
241.0	288.10	1862.7	2.7	99.7	288.17	1633.2	2.1
250.9	288.13	1878.5	2.7	149.8	288.08	1717.5	2.3
260.7	288.13	1894.1	2.7	200.2	288.16	1800.9	2.5
271.0	288.05	1909.8	2.8	250.0	288.12	1878.5	2.7
280.7	288.11	1924.4	2.8	299.8	288.11	1952.9	2.9
290.8	288.11	1939.1	2.8	349.6	288.09	2026.1	3.0
300.7	288.07	1953.9	2.9	401.3	288.17	2098.0	3.2
310.9	288.08	1969.0	2.9	499.7	288.10	2225.7	3.4
319.8	288.12	1982.2	2.9	599.5	288.09	2345.8	3.7
330.3	288.13	1997.6	3.0	699.8	288.08	2453.6	3.9
340.4	288.12	2012.0	3.0	0.1	288.13	1462.4	1.8
350.8	288.08	2026.4	3.0	50.9	288.15	1550.1	1.8
359.6	288.09	2038.6	3.0	99.8	288.16	1631.8	2.1
370.6	288.10	2054.0	3.1	150.3	288.14	1718.5	2.3
380.9	288.12	2068.6	3.1	200.3	288.12	1800.1	2.5
390.4	288.12	2081.6	3.1	250.5	288.08	1878.9	2.7
400.3	288.08	2094.6	3.2	300.4	288.13	1955.1	2.9
410.2	288.08	2107.3	3.2	349.2	288.15	2025.9	3.0
419.7	288.01	2119.9	3.2	399.8	288.12	2094.8	3.2
429.6	288.06	2133.0	3.2	499.5	288.10	2226.5	3.4
440.3	288.07	2148.1	3.3	600.9	288.07	2346.8	3.7
450.3	288.00	2162.1	3.3	701.0	288.13	2453.9	3.9
460.0	288.08	2175.1	3.3				
T = 298.15 K							
p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$
0.1	298.35	1492.75	1.8	50.1	298.20	1580.4	1.9
9.6	298.32	1512.29	1.9	60.3	298.25	1597.7	2.0
19.9	298.36	1530.15	1.9	70.4	298.22	1614.3	2.1

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
30.1	298.39	1548.38	1.9	80.5	298.17	1632.1	2.1
40.1	298.34	1564.68	2.0	90.4	298.13	1647.6	2.1
50.2	298.34	1580.86	1.9	100.4	298.31	1662.8	2.2
60.4	298.32	1598.61	2.0	110.6	298.31	1680.6	2.2
70.2	298.29	1615.23	2.1	120.6	298.24	1696.1	2.2
80.4	298.32	1632.91	2.1	130.6	298.25	1710.4	2.3
90.6	298.35	1648.80	2.1	140.5	298.31	1726.4	2.3
100.4	298.36	1664.18	2.2	150.7	298.27	1743.9	2.4
110.6	298.36	1682.43	2.2	160.8	298.17	1759.6	2.4
120.5	298.40	1697.53	2.2	170.8	298.21	1774.8	2.4
130.6	298.33	1711.57	2.3	180.6	298.23	1790.4	2.5
140.8	298.31	1728.31	2.3	190.7	298.21	1806.1	2.5
150.8	298.30	1744.98	2.4	200.8	298.16	1821.6	2.5
160.5	298.40	1760.41	2.4	210.7	298.17	1836.6	2.6
170.9	298.39	1777.11	2.4	220.8	298.13	1852.2	2.6
180.8	298.30	1792.34	2.5	230.5	298.18	1867.0	2.6
189.6	298.33	1805.03	2.5	240.8	298.25	1882.3	2.7
199.8	298.34	1820.74	2.5	250.7	298.31	1897.4	2.7
209.8	298.36	1836.18	2.6	260.9	298.20	1912.6	2.8
219.4	298.33	1850.61	2.6	270.9	298.20	1926.9	2.8
229.3	298.37	1864.79	2.6	280.8	298.18	1941.0	2.8
240.7	298.36	1881.66	2.7	290.9	298.18	1955.2	2.9
249.2	298.29	1894.60	2.7	300.5	298.16	1968.4	2.9
259.7	298.29	1909.86	2.8	310.7	298.22	1982.6	2.9
270.0	298.36	1924.58	2.8	319.9	298.14	1995.7	2.9
280.1	298.34	1938.93	2.8	330.4	298.20	2010.6	3.0
290.0	298.26	1953.18	2.8	341.0	298.15	2025.6	3.0
299.0	298.30	1965.68	2.9	350.6	298.12	2038.7	3.0
309.6	298.34	1980.33	2.9	359.7	298.20	2050.6	3.1
320.0	298.29	1995.10	2.9	370.6	298.13	2064.9	3.1
330.9	298.27	2011.17	3.0	380.7	298.17	2078.0	3.1
340.0	298.33	2023.88	3.0	390.6	298.12	2090.6	3.1
350.9	298.28	2038.41	3.0	400.5	298.15	2103.8	3.2
359.6	298.34	2049.68	3.1	410.9	298.17	2117.8	3.2
369.8	298.28	2063.10	3.1	420.4	298.15	2130.3	3.2
378.5	298.30	2074.41	3.1	429.2	298.15	2141.5	3.3
390.6	298.34	2089.91	3.1	440.7	298.17	2155.8	3.3
400.4	298.24	2102.34	3.2	450.3	298.18	2167.6	3.3
411.1	298.28	2116.23	3.2	460.2	298.11	2179.6	3.3
419.7	298.29	2127.41	3.2	470.2	298.13	2191.9	3.4
430.6	298.27	2141.39	3.3	480.3	298.16	2204.8	3.4
440.9	298.36	2154.44	3.3	490.3	298.08	2217.6	3.4
449.9	298.42	2165.52	3.3	500.0	298.15	2229.8	3.4
459.9	298.32	2177.34	3.3	509.9	298.06	2241.4	3.5
470.0	298.37	2188.78	3.4	519.8	298.13	2252.4	3.5

p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$
480.3	298.45	2201.12	3.4	530.5	298.11	2264.2	3.5
489.8	298.36	2213.08	3.4	541.2	298.18	2275.5	3.5
499.7	298.43	2225.83	3.4	551.3	298.11	2287.0	3.6
509.9	298.34	2238.73	3.5	559.8	298.13	2298.5	3.6
519.7	298.39	2250.15	3.5	569.5	298.08	2310.1	3.6
529.3	298.43	2261.15	3.5	580.8	298.03	2322.4	3.6
539.1	298.36	2272.66	3.5	589.4	298.06	2333.2	3.7
549.2	298.43	2287.65	3.6	599.2	298.10	2344.5	3.7
560.7	298.40	2299.86	3.6	621.3	298.08	2369.2	3.7
571.3	298.35	2311.91	3.6	641.0	298.05	2390.7	3.8
581.0	298.41	2323.81	3.6	659.8	298.09	2412.6	3.8
590.8	298.41	2335.39	3.7	680.3	298.17	2431.9	3.9
601.8	298.45	2347.68	3.7	699.9	298.07	2450.3	3.9
609.1	298.42	2356.24	3.7	0.1	297.90	1493.8	1.8
619.8	298.36	2367.84	3.7	50.6	297.88	1580.3	1.9
631.4	298.36	2379.86	3.8	99.5	297.99	1660.6	2.2
639.8	298.42	2388.35	3.8	151.0	297.88	1743.2	2.4
651.7	298.41	2400.73	3.8	200.2	297.84	1819.5	2.5
660.5	298.30	2411.39	3.8	250.3	297.79	1895.5	2.7
669.2	298.41	2421.98	3.9	300.3	297.83	1967.2	2.9
679.2	298.34	2432.83	3.9	349.2	298.05	2035.4	3.0
689.0	298.40	2438.98	3.9	400.3	297.89	2101.3	3.2
699.0	298.38	2448.04	3.9	450.5	297.90	2165.2	3.3
0.1	298.37	1492.2	1.8	499.5	297.80	2225.4	3.4
9.6	298.54	1512.1	1.9	549.7	297.79	2286.1	3.6
20.1	298.25	1529.7	1.9	601.7	297.82	2346.1	3.7
30.2	298.28	1547.6	1.9	653.2	297.78	2402.2	3.8
40.2	298.22	1564.6	2.0	702.2	297.74	2448.7	3.9

T = 308.15 K

p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$	p MPa	T K	$u_s$ $m \cdot s^{-1}$	$u_c(u_s)$ $m \cdot s^{-1}$
0.1	308.15	1514.3	1.9	519.8	308.11	2253.9	3.5
20.8	308.22	1554.3	1.9	539.5	308.06	2277.6	3.5
50.6	308.22	1605.5	1.9	559.7	308.09	2301.4	3.6
81.0	308.14	1658.2	2.1	581.6	308.11	2324.8	3.6
111.0	308.16	1706.1	2.2	599.6	308.13	2344.5	3.7
141.2	308.17	1750.8	2.4	622.1	308.21	2369.3	3.7
160.1	308.11	1781.2	2.4	639.8	308.16	2388.9	3.8
170.6	308.06	1795.9	2.5	662.7	308.20	2410.9	3.8
180.7	308.07	1809.8	2.5	680.6	308.11	2426.8	3.9
190.4	308.10	1824.3	2.5	701.6	308.14	2447.4	3.9
200.7	308.12	1840.1	2.6	0.1	308.11	1515.3	1.9
210.9	308.10	1855.6	2.6	50.3	308.17	1604.9	1.9
220.7	308.11	1870.1	2.6	99.7	308.14	1690.4	2.2

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub> (u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub> (u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
230.7	308.15	1884.5	2.7	149.9	308.12	1766.1	2.4
240.6	308.17	1898.5	2.7	200.4	308.12	1840.6	2.6
250.8	308.15	1913.1	2.7	250.5	308.19	1913.9	2.7
260.9	308.11	1927.7	2.8	299.9	308.12	1984.1	2.9
271.0	308.08	1942.0	2.8	349.8	308.13	2049.7	3.1
280.9	308.09	1955.6	2.8	400.0	308.09	2112.1	3.2
291.0	308.12	1969.4	2.9	449.3	308.07	2173.3	3.3
300.5	308.08	1983.1	2.9	499.4	308.15	2232.5	3.4
310.6	308.13	1997.3	2.9	549.7	308.17	2292.4	3.6
321.0	308.20	2010.8	3.0	601.7	308.10	2349.8	3.7
330.7	308.23	2022.9	3.0	650.7	308.11	2402.3	3.8
340.9	308.21	2035.9	3.0	703.6	308.09	2441.6	3.9
350.9	308.10	2048.9	3.1	0.1	308.15	1514.1	1.9
359.8	308.13	2061.0	3.1	51.0	308.13	1606.0	1.9
370.8	308.14	2075.3	3.1	99.8	308.17	1690.0	2.2
379.4	308.13	2085.4	3.1	150.3	308.14	1766.1	2.4
390.3	308.14	2098.4	3.2	200.3	308.17	1839.8	2.6
400.7	308.12	2110.8	3.2	250.5	308.10	1913.4	2.7
411.1	308.10	2123.4	3.2	299.9	308.10	1983.2	2.9
420.6	308.07	2135.2	3.2	349.4	308.09	2048.7	3.1
431.0	308.10	2148.3	3.3	400.4	308.06	2112.6	3.2
440.4	308.09	2160.0	3.3	450.9	308.15	2174.9	3.3
449.9	308.14	2171.7	3.3	499.7	308.21	2232.3	3.4
460.0	308.13	2183.6	3.3	549.6	308.19	2291.0	3.6
480.8	308.14	2208.5	3.4	599.6	308.22	2346.6	3.7
499.5	308.09	2230.5	3.4	650.8	308.09	2402.2	3.8

**T = 318.15 K**

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub> (u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub> (u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
0.1	317.92	1530.3	1.9	340.9	318.11	2049.7	3.0
49.1	318.26	1621.2	1.9	350.8	318.02	2062.0	3.1
99.7	318.21	1706.9	2.2	360.5	318.03	2074.1	3.1
150.4	318.22	1788.9	2.4	369.7	318.08	2085.2	3.1
200.2	318.19	1861.8	2.6	379.4	318.11	2096.9	3.1
250.0	318.15	1930.6	2.8	390.3	318.12	2110.2	3.2
300.1	318.10	1998.9	2.9	399.6	318.13	2121.7	3.2
349.6	318.09	2062.1	3.1	410.9	318.11	2135.5	3.2
399.7	318.06	2122.5	3.2	420.5	318.12	2147.2	3.3
449.7	318.14	2182.1	3.3	430.6	318.10	2159.3	3.3
499.8	318.17	2240.9	3.5	439.9	318.12	2170.3	3.3
549.2	318.16	2297.1	3.6	449.8	318.10	2181.8	3.3
599.1	318.12	2350.3	3.7	459.4	318.03	2193.0	3.4
651.0	318.15	2405.8	3.8	480.0	318.14	2217.1	3.4
701.7	318.19	2454.7	3.9	499.9	318.19	2239.9	3.5

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
0.1	318.16	1530.9	1.9	519.3	318.15	2261.5	3.5
20.6	318.19	1571.8	2.0	541.2	318.19	2286.2	3.6
50.4	318.12	1623.1	1.9	559.3	318.16	2305.4	3.6
80.9	318.14	1675.5	2.2	579.4	318.18	2325.7	3.6
111.2	318.14	1725.7	2.3	599.6	318.12	2346.3	3.7
141.3	318.10	1771.9	2.4	619.2	318.17	2366.6	3.7
160.1	318.11	1802.4	2.5	641.8	318.12	2388.1	3.8
170.7	318.08	1818.2	2.5	660.3	318.17	2411.3	3.8
179.7	318.05	1832.1	2.5	679.7	318.19	2431.6	3.9
190.3	318.02	1847.0	2.6	701.8	318.14	2454.2	3.9
200.6	318.02	1860.6	2.6	0.1	318.21	1530.2	1.9
210.4	318.05	1874.6	2.6	50.0	318.17	1622.5	1.9
220.4	318.05	1889.4	2.7	99.5	318.07	1705.7	2.2
230.4	318.08	1903.8	2.7	150.1	318.11	1787.1	2.4
240.8	318.09	1917.3	2.7	200.4	318.10	1860.8	2.6
250.6	318.11	1930.2	2.8	250.4	318.13	1930.2	2.8
260.8	318.11	1944.0	2.8	299.4	318.10	1995.8	2.9
271.0	318.09	1957.1	2.8	349.6	318.10	2061.0	3.1
280.7	318.10	1969.7	2.9	401.3	318.16	2123.6	3.2
290.5	318.08	1983.2	2.9	450.6	318.18	2183.6	3.3
299.9	318.12	1996.4	2.9	499.1	318.17	2239.1	3.5
311.1	318.29	2011.7	3.0	549.4	318.17	2295.5	3.6
320.9	318.37	2024.6	3.0	602.1	318.21	2348.1	3.7
330.8	318.12	2037.0	3.0	651.2	318.19	2401.2	3.8

**T = 328.15 K**

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
0.1	328.27	1542.1	1.9	551.0	328.72	2304.7	3.6
50.9	328.14	1636.9	1.9	601.3	328.76	2354.9	3.7
100.1	328.12	1720.7	2.2	650.7	328.66	2404.5	3.8
150.0	328.10	1799.2	2.4	700.4	328.77	2453.8	4.0
200.2	328.13	1875.4	2.6	0.1	328.78	1541.1	1.9
250.7	328.19	1947.4	2.8	11.0	328.64	1563.6	1.9
300.0	328.15	2015.6	2.9	20.1	328.52	1581.8	2.0
351.7	328.16	2077.1	3.1	30.1	328.64	1599.7	2.0
400.1	328.22	2137.3	3.2	40.3	328.52	1617.3	2.0
450.9	328.14	2192.0	3.3	50.2	328.64	1635.6	1.9
499.6	328.08	2246.7	3.5	60.3	328.44	1653.0	2.1
550.7	328.07	2301.2	3.6	70.2	328.62	1669.9	2.1
601.9	328.16	2353.3	3.7	80.6	328.54	1687.3	2.2
652.7	328.21	2406.9	3.8	90.5	328.63	1703.3	2.2
700.1	328.16	2453.2	3.9	100.5	328.67	1720.2	2.2
0.1	328.19	1541.1	1.9	110.3	328.58	1736.1	2.3
20.9	328.22	1583.0	2.0	120.4	328.59	1751.5	2.3



<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
50.6	328.17	1636.4	1.9	130.4	328.45	1769.0	2.4
81.0	328.20	1688.0	2.2	140.6	328.78	1785.7	2.4
109.2	328.08	1735.6	2.3	150.5	328.69	1800.3	2.4
139.3	328.14	1783.8	2.4	160.5	328.75	1816.1	2.5
159.9	328.16	1816.0	2.5	170.8	328.63	1832.8	2.5
170.5	328.18	1831.9	2.5	180.8	328.50	1847.8	2.5
180.6	328.13	1846.2	2.5	190.6	328.83	1862.0	2.6
190.7	328.13	1860.6	2.6	200.8	328.74	1876.9	2.6
200.9	328.17	1876.4	2.6	210.9	328.83	1891.3	2.7
210.6	328.16	1891.1	2.7	220.9	328.71	1904.8	2.7
220.9	328.17	1905.0	2.7	230.8	328.60	1918.5	2.7
230.8	328.16	1918.1	2.7	240.6	328.69	1932.7	2.8
240.7	328.17	1932.3	2.8	250.7	328.78	1947.3	2.8
250.7	328.18	1946.5	2.8	260.8	328.47	1961.0	2.8
260.5	328.16	1960.2	2.8	271.0	328.61	1974.4	2.9
271.0	328.16	1974.2	2.9	281.1	328.63	1987.8	2.9
280.6	328.16	1987.2	2.9	291.0	328.61	2001.0	2.9
290.9	328.20	2001.0	2.9	300.6	328.52	2013.6	2.9
300.8	328.14	2013.9	2.9	310.6	328.56	2026.0	3.0
310.7	328.19	2026.4	3.0	320.9	328.73	2038.4	3.0
320.5	328.16	2038.8	3.0	331.0	328.55	2050.3	3.0
330.4	328.24	2051.4	3.0	341.1	328.56	2062.6	3.1
341.1	328.08	2063.6	3.1	350.9	328.58	2074.7	3.1
350.7	328.08	2075.4	3.1	359.7	328.63	2085.3	3.1
360.5	328.15	2086.6	3.1	370.8	328.61	2098.4	3.1
369.4	328.18	2096.4	3.1	380.4	328.71	2109.6	3.2
380.3	328.17	2109.1	3.2	389.4	328.74	2120.3	3.2
389.2	328.14	2119.9	3.2	400.5	328.79	2133.5	3.2
399.7	328.16	2133.0	3.2	409.3	328.69	2143.5	3.2
409.6	328.17	2144.7	3.2	420.2	328.70	2155.4	3.3
421.5	328.18	2158.2	3.3	429.1	328.81	2165.4	3.3
430.7	328.21	2168.3	3.3	440.8	328.62	2179.2	3.3
440.8	328.14	2179.4	3.3	450.6	328.66	2191.6	3.3
449.8	328.21	2189.2	3.3	459.5	328.83	2203.0	3.4
459.5	328.15	2200.2	3.4	469.6	328.63	2215.7	3.4
480.3	328.16	2224.9	3.4	479.7	328.68	2227.0	3.4
499.4	328.16	2246.5	3.5	490.5	328.88	2237.9	3.4
519.1	328.16	2268.6	3.5	499.9	328.65	2247.3	3.5
539.5	328.19	2290.6	3.6	509.9	328.66	2257.4	3.5
560.5	327.96	2312.8	3.6	519.7	328.75	2267.8	3.5
580.7	328.02	2334.1	3.7	529.7	328.60	2278.5	3.5
601.2	328.16	2355.9	3.7	540.1	328.78	2289.9	3.6
619.7	328.01	2375.9	3.7	549.9	328.82	2300.7	3.6
641.4	327.92	2396.1	3.8	559.4	328.63	2310.8	3.6
659.8	328.04	2413.6	3.8	569.1	328.87	2321.5	3.6

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
681.1	327.83	2433.2	3.9	579.5	328.71	2332.5	3.7
701.7	327.97	2451.4	3.9	589.3	328.65	2342.8	3.7
0.1	328.76	1543.9	1.9	601.8	328.54	2355.2	3.7
50.9	328.73	1637.5	1.9	611.2	328.74	2365.3	3.7
99.8	328.49	1720.6	2.3	619.4	328.61	2373.2	3.7
150.1	328.83	1799.9	2.4	631.4	328.67	2384.7	3.8
200.1	328.72	1874.3	2.6	639.4	328.71	2392.6	3.8
250.1	328.90	1944.4	2.8	651.6	328.60	2404.8	3.8
300.0	328.69	2012.1	3.0	660.6	328.57	2413.8	3.8
350.9	328.77	2076.6	3.1	670.5	328.65	2423.5	3.9
400.5	328.72	2138.4	3.2	680.9	328.83	2433.1	3.9
449.2	328.74	2194.3	3.4	691.9	328.77	2443.0	3.9
499.4	328.92	2250.4	3.5	700.9	328.74	2452.0	3.9

**T = 338.15 K**

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
0.1	338.02	1547.4	1.7	361.0	338.02	2097.9	2.8
8.8	337.75	1567.8	1.8	369.9	338.12	2108.0	2.8
19.8	338.09	1589.2	1.8	379.6	337.83	2119.3	2.8
30.0	337.97	1607.3	1.8	389.3	337.90	2131.1	2.8
39.9	338.17	1625.3	1.8	399.1	337.69	2142.9	2.8
50.1	337.87	1643.6	1.9	411.2	337.82	2157.1	2.9
60.2	337.81	1661.7	1.9	421.3	338.17	2168.9	2.9
70.3	338.25	1679.9	1.9	431.2	338.04	2180.8	2.9
80.5	338.06	1697.4	2.0	441.0	338.17	2191.9	2.9
90.5	338.07	1714.7	2.0	451.0	338.12	2203.4	2.9
100.5	337.95	1731.6	2.0	460.4	338.02	2213.9	3.0
110.6	337.88	1747.6	2.1	470.2	338.04	2225.4	3.0
120.5	337.69	1764.1	2.1	480.9	338.05	2238.4	3.0
130.1	337.63	1780.0	2.1	490.5	337.78	2250.1	3.0
140.6	338.12	1796.3	2.2	501.1	337.80	2260.0	3.0
150.0	337.66	1810.9	2.2	510.4	338.03	2269.8	3.1
160.8	337.90	1827.9	2.2	519.8	338.00	2280.0	3.1
170.2	338.03	1842.2	2.3	529.5	337.96	2289.9	3.1
180.5	337.89	1857.4	2.3	539.5	338.05	2300.0	3.1
190.1	337.63	1871.4	2.3	549.6	338.22	2309.8	3.1
200.5	337.75	1886.0	2.3	560.5	337.95	2320.2	3.1
210.3	337.80	1899.5	2.4	571.1	337.88	2330.4	3.2
220.3	337.87	1913.8	2.4	580.5	337.97	2339.5	3.2
230.8	337.61	1929.6	2.4	589.9	337.84	2348.8	3.2
240.2	337.69	1942.9	2.5	601.1	338.04	2360.1	3.2
250.3	338.15	1956.7	2.5	611.6	337.75	2370.6	3.2
260.5	337.91	1970.2	2.5	622.2	337.83	2381.3	3.2
271.0	338.17	1984.8	2.5	630.7	337.70	2390.3	3.3

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
280.7	337.91	1998.2	2.6	641.9	337.92	2401.3	3.3
290.0	338.07	2010.5	2.6	650.6	338.07	2410.2	3.3
300.7	337.85	2024.0	2.6	662.4	337.90	2421.3	3.3
310.8	338.19	2036.5	2.6	671.7	337.76	2430.4	3.3
320.3	337.95	2048.6	2.7	681.9	338.07	2439.4	3.4
330.9	337.87	2062.2	2.7	692.2	338.00	2448.6	3.4
339.1	337.99	2072.6	2.7	700.8	338.22	2455.7	3.4
350.5	337.69	2086.1	2.7				

**T = 348.15 K**

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
0.1	349.19	1549.0	1.7	359.7	349.02	2103.1	2.8
8.8	349.35	1569.9	1.8	370.9	349.26	2116.4	2.8
19.8	349.31	1592.3	1.8	380.9	349.33	2128.8	2.8
29.9	349.14	1610.5	1.8	390.3	349.23	2140.3	2.8
40.1	349.78	1629.5	1.8	400.7	349.28	2153.0	2.9
49.9	349.18	1647.8	1.9	410.7	349.10	2164.7	2.9
60.1	349.40	1666.5	1.9	419.5	349.23	2175.1	2.9
70.2	349.68	1684.9	1.9	430.8	349.34	2187.6	2.9
80.3	349.53	1702.5	2.0	440.3	349.35	2197.8	2.9
90.3	349.26	1720.3	2.0	450.8	349.35	2209.4	3.0
100.4	349.41	1737.3	2.0	460.2	349.27	2220.1	3.0
110.3	349.34	1753.6	2.1	469.5	349.27	2231.5	3.0
120.5	349.49	1770.3	2.1	480.2	349.42	2245.0	3.0
130.6	349.00	1787.1	2.1	490.3	349.39	2256.6	3.0
140.5	349.35	1802.5	2.2	500.6	349.12	2267.1	3.0
150.7	349.22	1818.4	2.2	510.4	349.27	2276.6	3.1
160.7	349.21	1834.2	2.2	520.4	349.35	2284.8	3.1
170.6	349.22	1849.2	2.3	529.7	349.17	2294.0	3.1
180.5	349.42	1863.7	2.3	539.5	349.55	2304.0	3.1
190.6	349.41	1878.2	2.3	549.2	349.27	2313.8	3.1
200.7	349.68	1892.8	2.4	559.3	349.53	2323.8	3.1
210.6	349.13	1907.1	2.4	569.3	349.27	2333.9	3.2
220.3	349.27	1921.6	2.4	579.9	349.30	2344.6	3.2
230.7	349.33	1936.5	2.4	589.2	349.46	2353.8	3.2
240.7	349.24	1950.7	2.5	601.7	349.03	2366.0	3.2
250.9	349.30	1965.0	2.5	609.2	349.03	2375.6	3.2
260.5	349.30	1978.6	2.5	620.6	349.31	2384.8	3.2
270.9	349.41	1992.9	2.6	630.3	349.37	2394.1	3.3
280.9	349.00	2005.9	2.6	641.0	349.31	2403.9	3.3
290.0	349.29	2016.9	2.6	651.4	349.59	2412.5	3.3
300.4	349.22	2029.7	2.6	662.5	349.33	2421.2	3.3
310.6	349.27	2042.1	2.7	672.8	349.38	2428.1	3.3
320.0	349.37	2054.6	2.7	683.8	349.45	2435.5	3.4

<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>p</b> <b>MPa</b>	<b>T</b> <b>K</b>	<b>u<sub>s</sub></b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>	<b>u<sub>c</sub>(u<sub>s</sub>)</b> <b>m·s<sup>-1</sup></b>
330.4	349.31	2068.4	2.7	693.3	349.29	2440.8	3.4
340.5	349.31	2081.1	2.7	704.5	349.72	2445.1	3.4
349.8	349.32	2091.6	2.7				



## ***APÉNDICE II***

### ***DATOS DE DENSIDAD Y VELOCIDAD DEL SONIDO DEL NaL***

---

En este apéndice se detallan los valores de densidad y velocidad del sonido a presión atmosférica del NaL en función de la temperatura para las dos series de experimentos llevados a cabo. Los valores de estas medidas han sido utilizados en los capítulos 5 y 7. En el Capítulo 5 se han utilizado las medidas de velocidad del sonido para obtener la CMC mediante los ajustes programados y posteriormente estudiar cómo varía la CMC en función de la temperatura. En el Capítulo 7 se han utilizado las dos magnitudes medidas para determinar el valor de algunas propiedades aparentes en función de la temperatura y estudiar la interacción entre el agua y el NaL.

T = 283.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.999859	1449.26	0.00513	0.999897	1449.57
0.01002	1.000031	1450.74	0.01025	1.000068	1451.01
0.01502	1.000195	1452.48	0.01534	1.000231	1452.56
0.01998	1.000384	1453.95	0.02044	1.000393	1454.08
0.02498	1.000552	1455.40	0.02552	1.000561	1455.52
0.02943	1.000807	1457.07	0.03011	1.000726	1456.74
0.03487	1.000846	1457.99	0.03571	1.000902	1458.01
0.04973	1.001230	1458.89	0.05074	1.001244	1458.90
0.06432	1.001521	1459.59	0.06572	1.001572	1459.80
0.07413	1.001928	1460.26	0.07568	1.001815	1460.34
0.08374	1.001945	1460.27	0.08529	--	--
0.09826	1.002378	1461.44	0.10047	1.002758	1461.83
T = 288.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.999256	1467.67	0.00513	0.999300	1467.67
0.01002	0.999417	1469.04	0.01025	0.999458	1469.12
0.01502	0.999578	1470.46	0.01534	0.999610	1470.53
0.01998	0.999757	1471.82	0.02044	0.999767	1471.93
0.02498	0.999916	1473.16	0.02552	0.999924	1473.30
0.02943	1.000159	1474.68	0.03011	1.000081	1474.42
0.03487	1.000167	1474.98	0.03571	1.000221	1475.09
0.04973	1.000510	1475.59	0.05074	1.000522	1475.64
0.06432	1.000778	1476.13	0.06572	1.000816	1476.40
0.07413	1.001143	1476.60	0.07568	1.001034	1476.76
0.08374	1.001213	1476.80	0.08529	--	--
0.09826	1.001563	1477.65	0.10047	1.00191	1478.15
T = 293.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.998358	1483.84	0.00513	0.998401	1483.84
0.01002	0.998510	1485.10	0.01025	0.998552	1485.19
0.01502	0.998661	1486.40	0.01534	0.998695	1486.45
0.01998	0.998833	1487.65	0.02044	0.998844	1487.78
0.02498	0.998983	1488.86	0.02552	0.998989	1489.04
0.02943	0.999201	1490.03	0.03011	0.999127	1489.85
0.03487	0.999195	1490.11	0.03571	0.999243	1490.14
0.04973	0.999516	1490.58	0.05074	0.999527	1490.54
0.06432	0.999746	1490.94	0.06572	0.999763	1491.17
0.07413	1.000077	1491.20	0.07568	0.999964	1491.37
0.08374	1.000144	1491.55	0.08529	1.000154	1491.58
0.09826	1.000425	1491.97	0.10047	1.000732	1492.36

T = 298.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.997180	1498.19	0.00513	0.997239	1498.00
0.01002	0.997339	1499.18	0.01025	0.997383	1499.25
0.01502	0.997485	1500.37	0.01534	0.997517	1500.42
0.01998	0.997627	1501.47	0.02044	0.997643	1501.58
0.02498	0.997757	1502.52	0.02552	0.997769	1502.63
0.02943	0.997929	1503.11	0.03011	0.997876	1503.10
0.03487	0.997947	1503.53	0.03571	0.997992	1503.32
0.04973	0.998260	1503.88	0.05074	0.998269	1503.83
0.06432	0.998478	1504.12	0.06572	0.998477	1504.13
0.07413	0.998776	1504.28	0.07568	0.998663	1504.27
0.08374	0.998833	1504.56	0.08529	0.998822	1504.31
0.09826	0.999081	1504.70	0.10047	0.999243	1504.28

T = 303.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.995774	1510.53	0.00513	0.995836	1510.31
0.01002	0.995929	1511.39	0.01025	0.995974	1511.44
0.01502	0.996066	1512.47	0.01534	0.996097	1512.53
0.01998	0.996181	1513.44	0.02044	0.996216	1513.60
0.02498	0.996298	1514.17	0.02552	0.996337	1514.53
0.02943	0.996452	1514.77	0.03011	0.996429	1514.82
0.03487	0.996487	1515.21	0.03571	0.996523	1515.03
0.04973	0.996734	1515.43	0.05074	0.996756	1515.37
0.06432	0.996964	1515.55	0.06572	0.996998	1515.43
0.07413	0.997204	1515.61	0.07568	0.997157	1515.46
0.08374	0.997314	1515.74	0.08529	0.997315	1515.47
0.09826	0.997570	1515.81	0.10047	0.997652	1515.43

T = 308.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.994166	1520.84	0.00513	0.994215	1520.90
0.01002	0.994248	1521.91	0.01025	0.994341	1521.90
0.01502	0.994416	1522.83	0.01534	0.994460	1522.91
0.01998	0.994540	1523.75	0.02044	0.994575	1523.92
0.02498	0.994651	1524.31	0.02552	0.994686	1524.70
0.02943	0.994793	1524.83	0.03011	0.994774	1524.90
0.03487	0.994825	1525.24	0.03571	0.994860	1525.07
0.04973	0.995059	1525.33	0.05074	0.995080	1525.26
0.06432	0.995275	1525.32	0.06572	0.995310	1525.17
0.07413	0.995503	1525.28	0.07568	0.995459	1525.15
0.08374	0.995606	1525.33	0.08529	0.995609	1525.07
0.09826	0.995847	1525.28	0.10047	0.995929	1524.78



T = 313.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.992338	1529.83	0.00513	0.992392	1529.88
0.01002	0.992391	1530.82	0.01025	0.992513	1530.80
0.01502	0.992574	1531.65	0.01534	0.992625	1531.73
0.01998	0.992698	1532.48	0.02044	0.992735	1532.63
0.02498	0.992801	1532.88	0.02552	0.992840	1533.31
0.02943	0.992937	1533.37	0.03011	0.992919	1533.46
0.03487	0.992967	1533.74	0.03571	0.993002	1533.58
0.04973	0.993188	1533.72	0.05074	0.993211	1533.62
0.06432	0.993392	1533.58	0.06572	0.993429	1533.46
0.07413	0.993611	1533.45	0.07568	0.993570	1533.35
0.08374	0.993708	1533.40	0.08529	0.993712	1533.20
0.09826	0.993934	1533.22	0.10047	0.994004	1532.74

T = 318.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.990311	1537.32	0.00513	0.990383	1537.36
0.01002	0.990394	1538.22	0.01025	0.990496	1538.20
0.01502	0.990542	1538.98	0.01534	0.990603	1539.06
0.01998	0.990669	1539.74	0.02044	0.990707	1539.87
0.02498	0.990731	1540.05	0.02552	0.990805	1540.45
0.02943	0.990899	1540.47	0.03011	0.990881	1540.58
0.03487	0.990925	1540.81	0.03571	0.990959	1540.65
0.04973	0.991136	1540.66	0.05074	0.991159	1540.58
0.06432	0.991331	1540.42	0.06572	0.991369	1540.30
0.07413	0.991539	1540.15	0.07568	0.991499	1540.13
0.08374	0.991631	1540.06	0.08529	0.991635	1539.90
0.09826	0.991852	1539.76	0.10047	0.991931	1539.25

T = 323.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.988135	1543.41	0.00513	0.988199	1543.45
0.01002	0.988194	1544.22	0.01025	0.988309	1544.21
0.01502	0.988349	1544.92	0.01534	0.988409	1545.00
0.01998	0.988470	1545.60	0.02044	0.988502	1545.72
0.02498	0.988534	1545.85	0.02552	0.988599	1546.23
0.02943	0.988689	1546.21	0.03011	0.988673	1546.34
0.03487	0.988716	1546.53	0.03571	0.988746	1546.38
0.04973	0.988915	1546.27	0.05074	0.988937	1546.19
0.06432	0.989103	1545.93	0.06572	0.989139	1545.82
0.07413	0.989302	1545.52	0.07568	0.989263	1545.56
0.08374	0.989389	1545.40	0.08529	0.989394	1545.26
0.09826	0.989599	1544.97	0.10047	0.989673	1544.44

T = 328.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.985735	1548.21	0.00513	0.985851	1548.23
0.01002	0.985787	1548.94	0.01025	0.985935	1548.94
0.01502	0.985978	1549.57	0.01534	0.986051	1549.65
0.01998	0.986107	1550.18	0.02044	0.986142	1550.30
0.02498	0.986345	1550.99	0.02552	0.986204	1550.75
0.02943	0.986319	1550.70	0.03011	0.986303	1550.84
0.03487	0.986345	1550.99	0.03571	0.986372	1550.85
0.04973	0.986534	1550.63	0.05074	0.986558	1550.56
0.06432	0.986713	1550.19	0.06572	0.986751	1550.08
0.07413	0.986904	1549.66	0.07568	0.986871	1549.75
0.08374	0.986989	1549.49	0.08529	0.986996	1549.37
0.09826	0.987189	1548.95	0.10047	0.987183	1548.40
T = 333.15 K					
Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>	Concentración mol·kg <sup>-1</sup>	Densidad g·cm <sup>-3</sup>	u <sub>s</sub> m·s <sup>-1</sup>
0.00503	0.983264	1551.78	0.00513	0.983347	1551.80
0.01002	0.983308	1552.43	0.01025	0.983446	1552.44
0.01502	0.983448	1552.99	0.01534	0.983537	1553.07
0.01998	0.983589	1553.55	0.02044	0.983625	1553.65
0.02498	0.983589	1553.70	0.02552	0.983703	1554.00
0.02943	0.983794	1553.98	0.03011	0.983778	1554.15
0.03487	0.983822	1554.26	0.03571	0.983848	1554.13
0.04973	0.983999	1553.80	0.05074	0.984027	1553.72
0.06432	0.984176	1553.27	0.06572	0.984212	1553.16
0.07413	0.984359	1552.64	0.07568	0.984327	1552.75
0.08374	0.984443	1552.40	0.08529	0.984448	1552.30
0.09826	0.984631	1551.75	0.10047	0.984681	1551.19



## ***APÉNDICE III***

# ***APLICACIÓN DE LAS MEDIDAS DE DENSIDAD Y VELOCIDAD DEL SONIDO DEL NaL: DETERMINACIÓN DE LA COMPRESIBILIDAD ADIABÁTICA***

---

### **AIII.I Introducción**

En este apéndice se mostrará la utilización de las medidas de densidad y velocidad del sonido del NaL para determinar la compresibilidad adiabática,  $\kappa_s$ , así como su aplicación para la determinación de la CMC a todas las temperaturas estudiadas y su posterior comparación con los resultados recogidos en la bibliografía.

### **AIII.II Medidas realizadas**

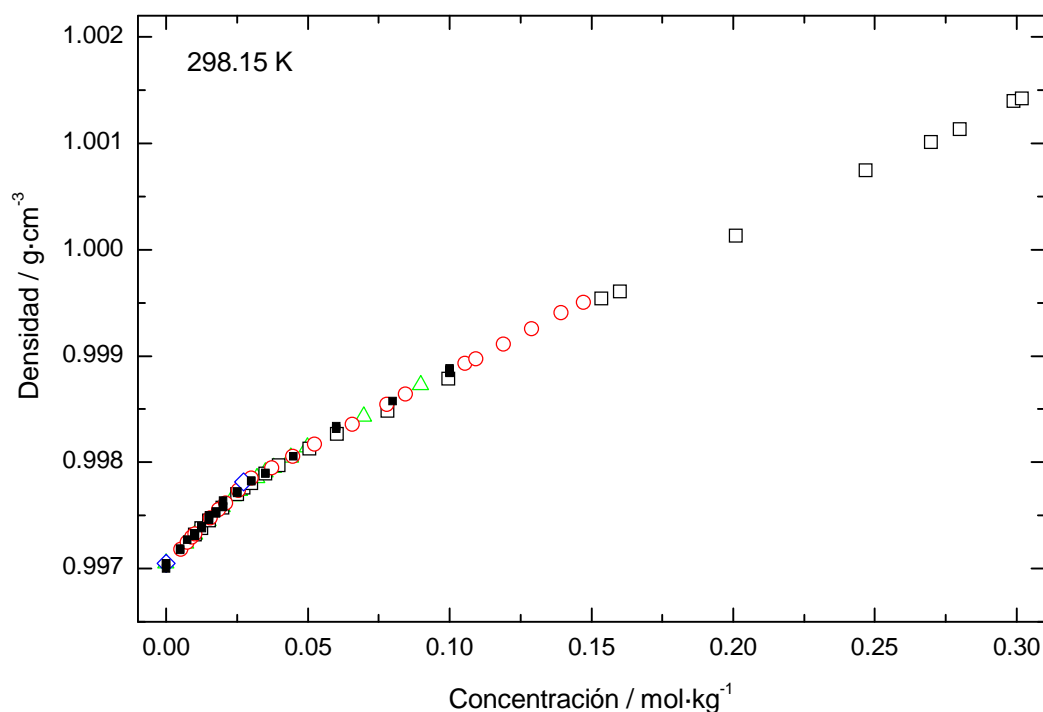
Como se mostró en el Apéndice II, se hicieron medidas de densidad y velocidad del sonido a presión atmosférica utilizando el equipo Anton Paar DSA 5000M (véase descripción en el Capítulo 3) en el intervalo de temperatura desde 283.15 K hasta 333.15 K con un incremento de 10.00 K. El intervalo de concentración estudiado fue desde 0 hasta 0.100 mol·kg<sup>-1</sup>, siendo el número total de disoluciones doce más el disolvente puro.

### AIII.III Resultados

#### AIII.III.I Medidas de densidad

- Variación con la concentración

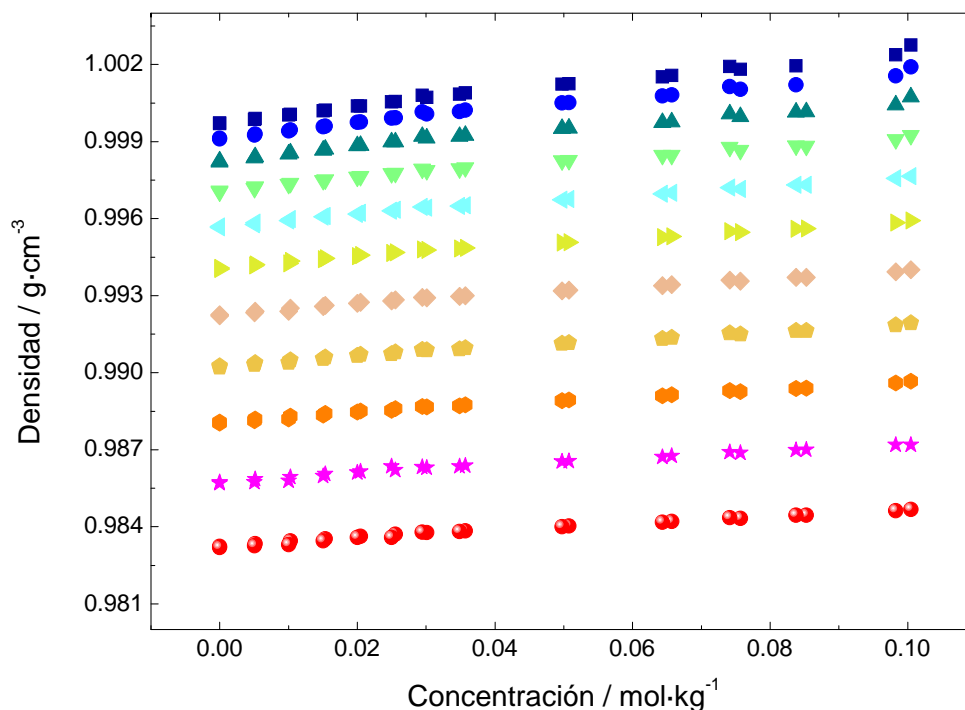
En primer lugar se muestra en la Figura AIII.I la comparación de las medidas de densidad a 298.15 K con otros autores.<sup>1,2,3,4</sup> Podemos comprobar en la figura como hay una buena concordancia entre todos los autores y los resultados de este trabajo. Se puede apreciar un cambio de pendiente en la densidad con la concentración que nos indica la CMC, si bien el cambio es mucho más sutil que en la velocidad del sonido, por lo que por eso es esta última una propiedad más adecuada para la determinación de la CMC como se puede ver en el Capítulo 5.



**Figura AIII.I.** Comparación de las medidas de densidad del NaL a 298.15 K con las bibliográficas. ( $\triangle$ ) Brun y col.<sup>1</sup> ( $\square$ ) Lisi y col.<sup>4</sup> ( $\circ$ ) Huang y Verrall<sup>3</sup> ( $\diamond$ ) Blanco y col.<sup>2</sup> ( $\blacksquare$ ) Este trabajo.

Una vez comprobada que la metodología de preparación de las disoluciones es correcta y que la metodología de medida de densidad también lo es, se procedió a hacer un estudio de la variación de la densidad con la temperatura con el fin de proceder posteriormente a estudiar sus propiedades aparentes (véase el Capítulo 7). En este apéndice se muestran únicamente las medidas de densidad y la determinación de la compresibilidad adiabática,  $\kappa_s$ , en función de la temperatura y su aplicación al cálculo de la CMC.

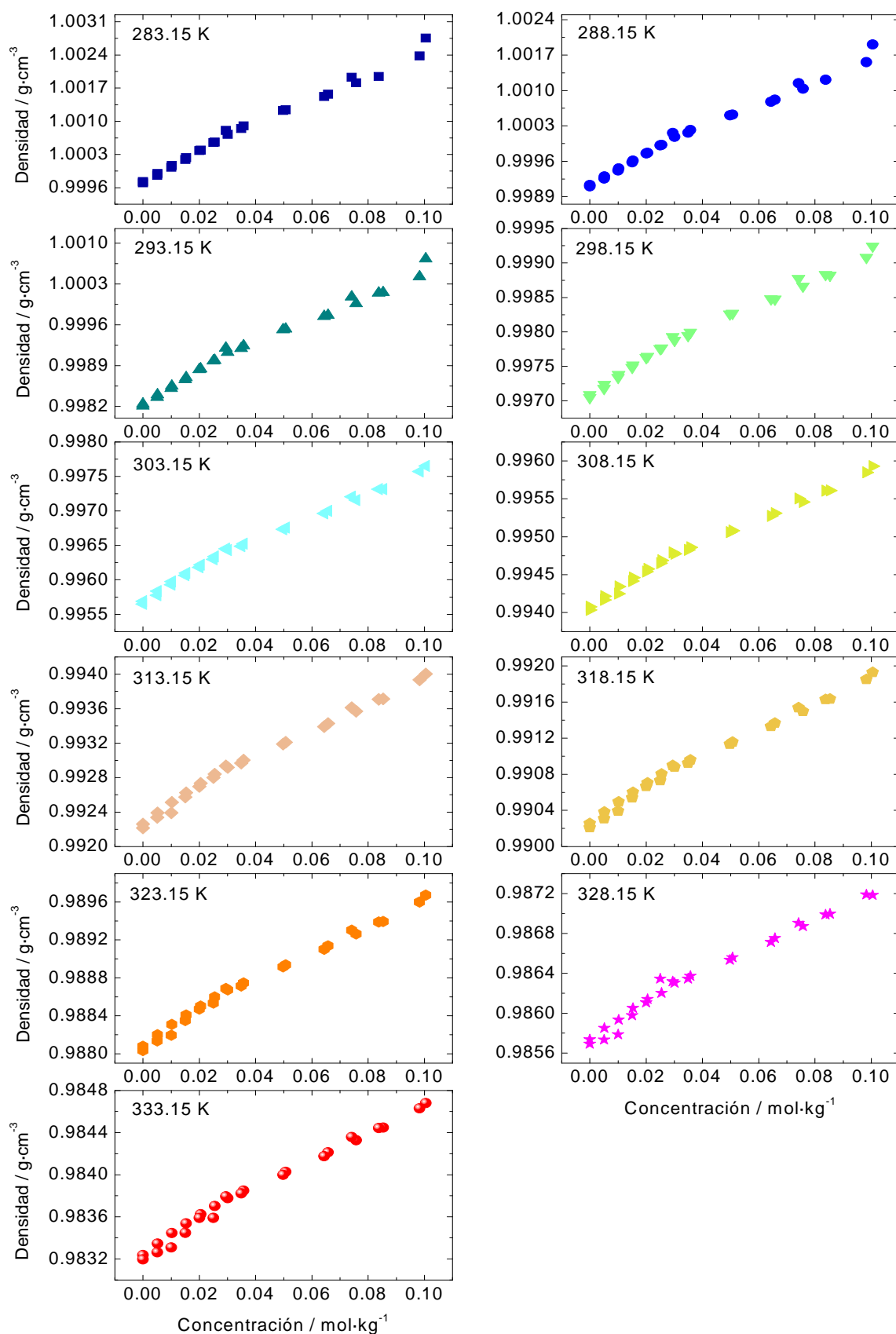
En la Figura AIII.II se representa la variación de la densidad con la concentración para las temperaturas de trabajo, desde 283.15 K hasta 333.15 K. Se observa que a partir de 308.15 K, la disminución de la densidad es más acusada para un mismo incremento de temperatura de 5.00 K.



**Figura AIII.II.** Variación de la densidad del NaL para dos series de experimentos en función de la temperatura desde 283.15 K hasta 333.15 K. (■) 283.15 K, (●) 288.15 K, (▲) 293.15 K, (▼) 298.15 K, (◀) 303.15 K, (▶) 308.15 K, (◆) 313.15 K, (◼) 318.15 K, (⬢) 323.15 K, (★) 328.15 K, (●) 333.15 K.

La densidad varía con la concentración para una misma temperatura un 0.33 % a 283.15 K y algo menos de la mitad, un 0.15 % a 333.15 K. La variación de la densidad con la concentración también podría ser utilizada para determinar el valor de CMC, pero como se aprecia en la Figura AIII.II y ya se ha comentado anteriormente, el cambio de pendiente que sufre es mucho más sutil que el de la velocidad del sonido, por lo que no resulta una propiedad muy adecuada para su determinación.

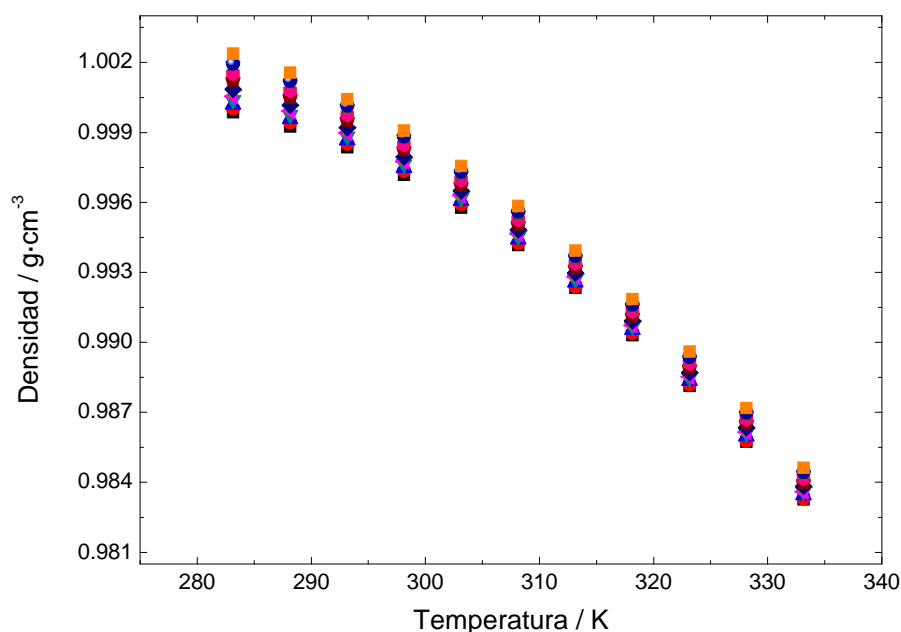
En la Figura AIII.III se muestra por separado para cada isoterma la variación de la densidad con la concentración



**Figura AIII.III.** Variación de la densidad de las disoluciones de NaL en función de la concentración con la temperatura. (■) 283.15 K, (●) 288.15 K, (▲) 293.15 K, (▼) 298.15 K, (◀) 303.15 K, (▶) 308.15 K, (◆) 313.15 K, (⬡) 318.15 K, (⬢) 323.15 K, (★) 328.15 K, (●) 333.15 K.

- **Variación con la temperatura**

Una vez estudiada la variación de la densidad con la concentración, se procede a la exposición de los resultados obtenidos cuando se representa esta propiedad frente a la temperatura para todas las concentraciones estudiadas.



**Figura AIII.IV.** Variación de la densidad con la temperatura para todas las concentraciones estudiadas. (■) 0.005; (●) 0.010; (▲) 0.015; (▼) 0.020; (◆) 0.025; (▶) 0.030; (◆) 0.035; (◆) 0.050; (◆) 0.065; (★) 0.075; (◆) 0.085; (■) 0.100 mol·kg<sup>-1</sup>.

Podemos ver en la Figura AIII.IV que las mayores diferencias en los valores de densidad para todas las concentraciones se producen a temperaturas bajas, y a medida que ésta aumenta, las diferencias van siendo cada vez menores y los valores más próximos entre sí.

### AIII.III.II Empleo de las medidas de densidad y velocidad del sonido

- **Determinación de la compresibilidad adiabática en función de la concentración**

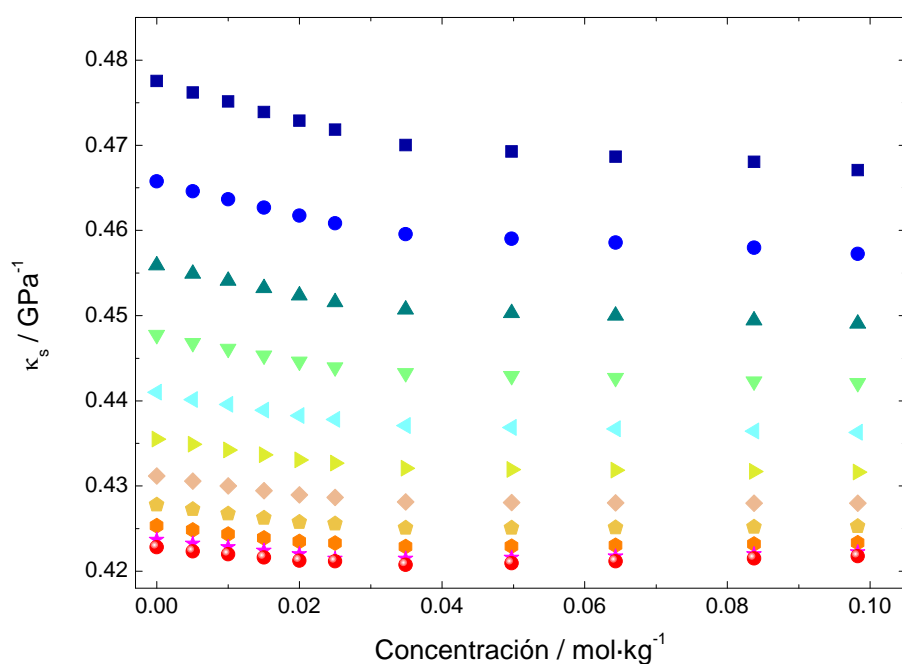
Las medidas de densidad y velocidad del sonido se han combinado con el objetivo de calcular la compresibilidad adiabática a presión atmosférica, utilizando la ecuación de Laplace:

$$\kappa_s = -\frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial P} \right)_s = \frac{1}{\rho u_s^2} \quad \text{Ecuación AIII.I}$$



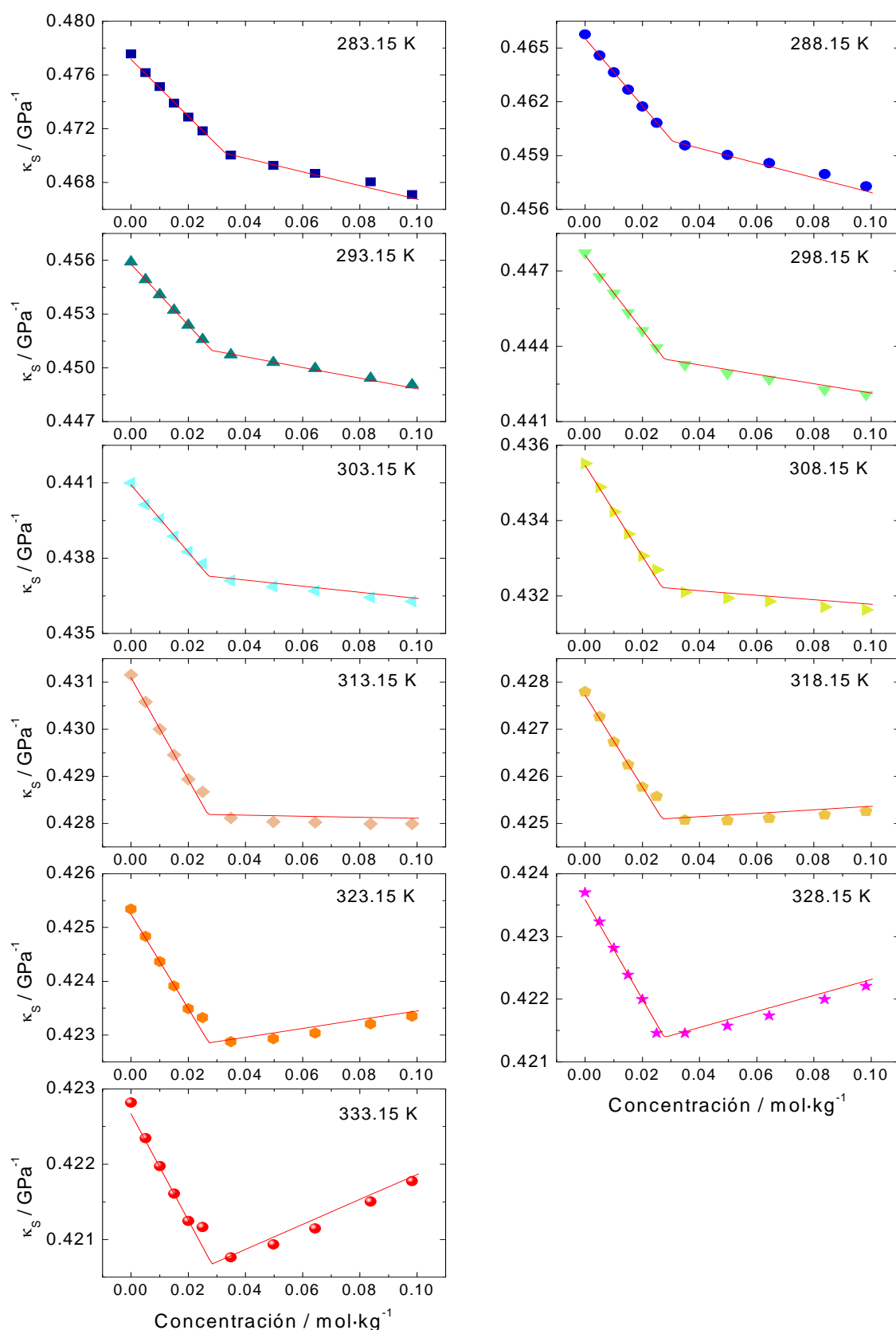
donde  $V$ ,  $P$ ,  $S$  y  $u_s$  son el volumen, la presión, la entropía y la velocidad del sonido respectivamente, y  $\kappa_s$  es el coeficiente de compresibilidad adiabático.

En la variación de la compresibilidad adiabática con la concentración se pueden distinguir dos zonas bien diferenciadas correspondientes a la región premicelar y la postmicelar, como se puede observar en la Figura AIII.V. La pendiente correspondiente a la zona premicelar es mayor que la de la zona postmicelar, al igual que ocurría en la representación de la variación de la velocidad del sonido con la concentración que se vio en el Capítulo 4.



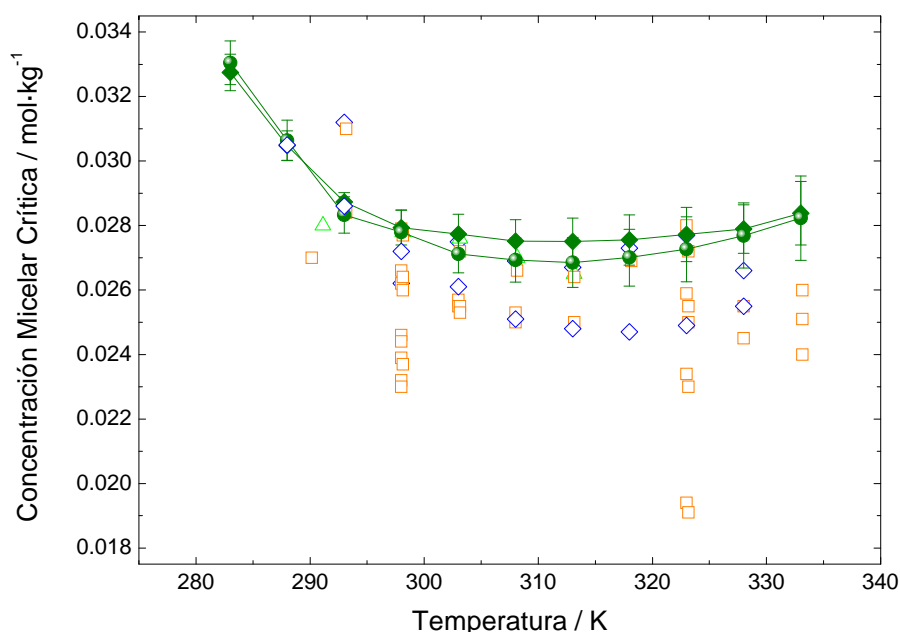
**Figura AIII.V.** Variación de la compresibilidad adiabática,  $\kappa_s$ , con la concentración para el NaL a diferentes temperaturas. (■) 283.15 K, (●) 288.15 K, (▲) 293.15 K, (▼) 298.15 K, (◄) 303.15 K, (◄) 308.15 K, (◆) 313.15 K, (⬡) 318.15 K, (●) 323.15 K, (★) 328.15 K, (●) 333.15 K.

A continuación, en la Figura AIII.VI se representa por separado para cada isoterma la variación de  $\kappa_s$  con la concentración. En esta figura se aprecia cómo la pendiente de la región premicelar va disminuyendo a medida que aumenta la temperatura y la de la región postmicelar va aumentando, pasando de ser negativa a positiva. Este cambio de pendiente se produce a partir de 313.15 K.



**Figura AIII.VI.** Variación de la compresibilidad adiabática,  $\kappa_s$ , con la concentración en función de la temperatura. (■) 283.15 K, (●) 288.15 K, (▲) 293.15 K, (▼) 298.15 K, (◄) 303.15 K, (►) 308.15 K, (◆) 313.15 K, (⬢) 318.15 K, (●) 323.15 K, (✱) 328.15 K, (●) 333.15 K.

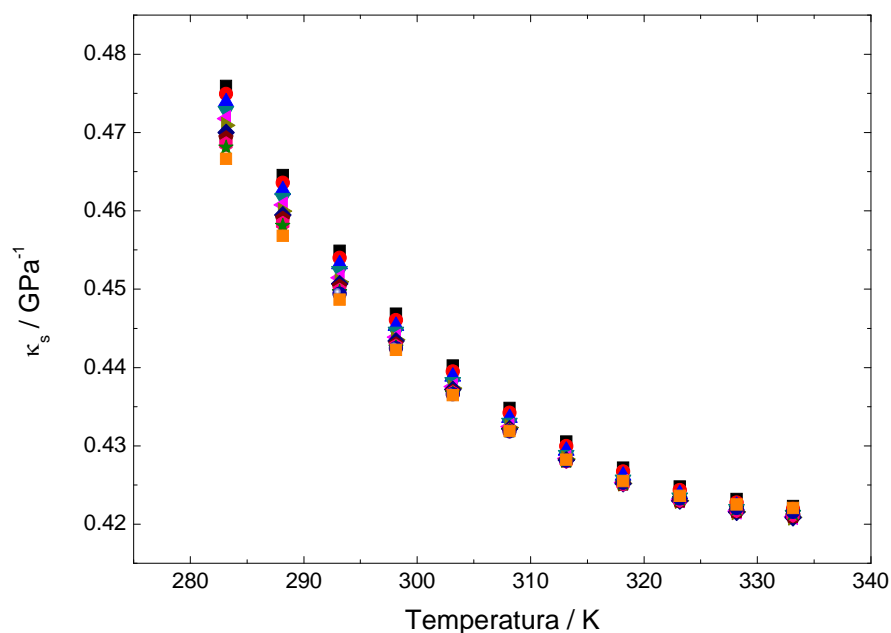
Este cambio tan acusado de pendientes entre la región premicelar y postmicelar puede ser utilizado para determinar la CMC y ver como varía ésta con la temperatura. Para ello, se utilizó el algoritmo programado en OriginPro 8.0® (véase Capítulo 5, Ecuación 5.1). Los resultados de estos ajustes corresponden a las líneas de trazo rojo en la Figura AIII.VI. Podemos comparar el valor de CMC obtenido a partir de las medidas de velocidad del sonido con el valor obtenido a partir de la combinación de las medidas de velocidad del sonido y densidad, es decir, a partir de la compresibilidad adiabática,  $\kappa_s$ . Estos resultados se muestran en la Figura AIII.VII, así como la comparación con otros resultados recogidos en la bibliografía.



**Figura AIII.VII.** Variación de la CMC con la temperatura para el NaL. (◇) Blanco y col.<sup>2</sup> (△) Brun y col.<sup>1</sup> (□) NSRDS<sup>5</sup> (●) Este trabajo a partir de velocidad del sonido (●) Este trabajo a partir de compresibilidad adiabática.

- **Determinación de la compresibilidad adiabática en función de la temperatura**

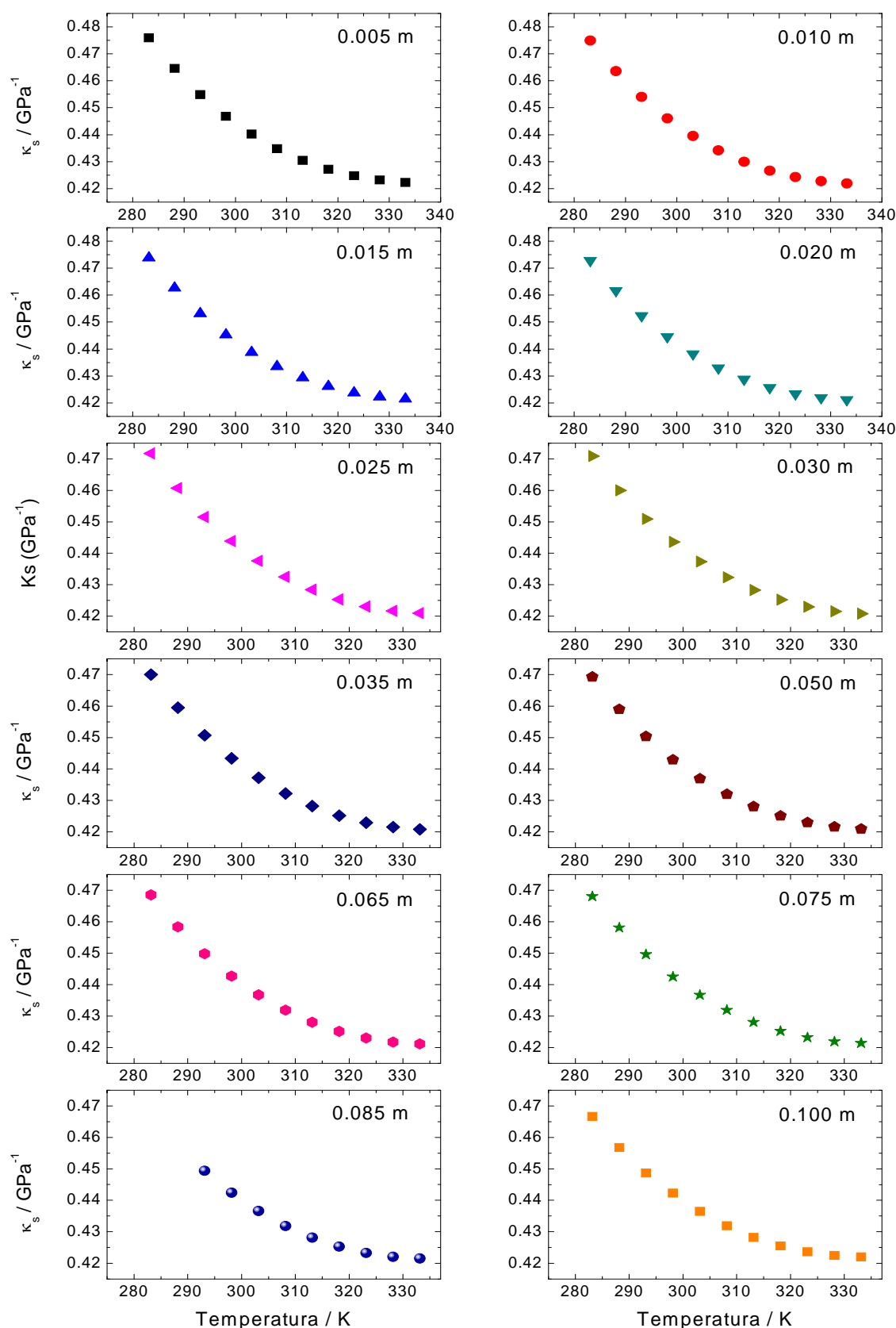
También resulta de interés estudiar cómo varía la compresibilidad adiabática en función de la temperatura para cada disolución de trabajo. En la Figura AIII.VIII podemos apreciar cómo a temperaturas bajas, el valor de  $\kappa_s$  difiere más desde la concentración más diluida a la más concentrada, y a medida que aumenta la temperatura, los valores de  $\kappa_s$  van siendo más similares entre sí, llegando incluso a ser prácticamente iguales. Para una misma temperatura, el valor de  $\kappa_s$  es mayor para concentraciones bajas que para concentraciones altas, puesto que es más fácil de comprimir al no haber agregados formados, únicamente monómeros en suspensión. A continuación, en la Figura AIII.VIII se representa dicha variación.



**Figura AIII.VIII.** Variación de la compresibilidad adiabática con la temperatura para todas las disoluciones estudiadas de NaL. (■) 0.005; (●) 0.010; (▲) 0.015; (▼) 0.020; (◆) 0.025; (◆) 0.030; (◆) 0.035; (◆) 0.050; (◆) 0.065; (◆) 0.075; (◆) 0.085; (◆) 0.100 mol·kg<sup>-1</sup>.

La variación de la compresibilidad adiabática con la temperatura es de una media del 11 % en todo el intervalo de concentración estudiado.

En la Figura AIII.IX. se representa la variación de  $\kappa_s$  con la temperatura para concentración por separado. La tendencia que sigue es la misma para todas las concentraciones independientemente que estemos por encima o por debajo de la CMC.



**Figura AIII.VIII.** Variación de la compresibilidad adiabática con la temperatura para todas las disoluciones estudiadas de NaI. (■) 0.005; (●) 0.010; (▲) 0.015; (▼) 0.020; (◄) 0.025; (►) 0.030; (◆) 0.035; (⬢) 0.050; (◐) 0.065; (★) 0.075; (●) 0.085; (◻) 0.100 mol·kg<sup>-1</sup>. m = mol·kg<sup>-1</sup>

### AIII.IV Referencias

- <sup>1</sup> Brun T. S., Hoiland H., Vikingstad E.; *J. Coll. Int. Science* **1978**, 64, 126-130.
- <sup>2</sup> Blanco E., González-Pérez A., Ruso J. M., Pedrido R., Prieto G., Sarmiento F.; *J. Coll. Int. Science* **2005**, 288, 247-260.
- <sup>3</sup> Huang H., Verrall R. E.; *Can. J. Chem.* **1997**, 75, 1445-1462.
- <sup>4</sup> De Lisi R., Inglese A., Milioto S., Pellerito A.; *J. Coll. Int. Science.* **1996**, 180, 174-187.
- <sup>5</sup> Murkerjee P., Mysels K. J., *NSRDS, National Standard Reference Data System, "Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems" 1971*, p.137.



## ***APÉNDICE IV***

# ***APLICACIÓN DE LAS MEDIDAS DE DENSIDAD Y VELOCIDAD DEL SONIDO DEL NaCas: DETERMINACIÓN DE LA COMPRESIBILIDAD ADIABÁTICA***

---

### **AIV.I Introducción**

En este apéndice se mostrará la aplicación de las medidas de densidad y velocidad del sonido del NaCas con objeto de determinar la compresibilidad adiabática,  $\kappa_s$ , así como su aplicación para intentar determinar la CMC.

En la literatura se describe la asociación de las moléculas de caseína  $\beta$  y  $\kappa$  como un proceso cooperativo comparable a la formación de micelas de jabón.<sup>1</sup> Las moléculas se ensamblan de forma espontánea a partir de una determinada concentración, pasando de haber monómeros en disolución a micelas formadas por cierto número de monómeros. Ese cambio repentino, de tener monómeros en suspensión a micelas, implica un cambio en ciertas propiedades macroscópicas del medio como la densidad o la velocidad del sonido como ya se ha visto en los capítulos 5 y 6 dedicados al estudio del NaL o las caseínas, respectivamente.

Para la caseína  $\beta$ , la CMC se sitúa, dependiendo de la técnica de caracterización utilizada,<sup>2</sup> entre 0.01 y 0.1 % p/p. La presencia de las cuatro caseínas en disolución, como ocurre al disolver caseinato de sodio en agua o en la propia leche, da lugar



también a la formación de micelas de caseína. Estas micelas se han observado mediante dispersión de luz. En disoluciones acuosas de caseinato de sodio, se describe la presencia de pequeños agregados de unos 11 nm de radio hidrodinámico a pH neutro y temperatura ambiente y fuerza iónica superior a 100 mM.<sup>3</sup> Otros autores han encontrado radios hidrodinámicos de entre 8 y 20 nm para estos agregados, y de entre 70-100 nm para los agregados más grandes. Aunque es de esperar que la dinámica de asociación de las caseínas esté determinada por la fracción dominante, en el caso de las caseínas  $\beta$  y  $\alpha_{s1}$ , no existe aún demasiada información sobre el proceso de agregación.

## **AIV.II Medidas realizadas**

Se llevaron a cabo medidas de densidad y velocidad del sonido a presión atmosférica utilizando el equipo Anton Paar DSA 5000M (véase descripción en el Capítulo 3) a 298.15 K. El intervalo de concentración estudiado fue desde 0 hasta 16 % p/p.

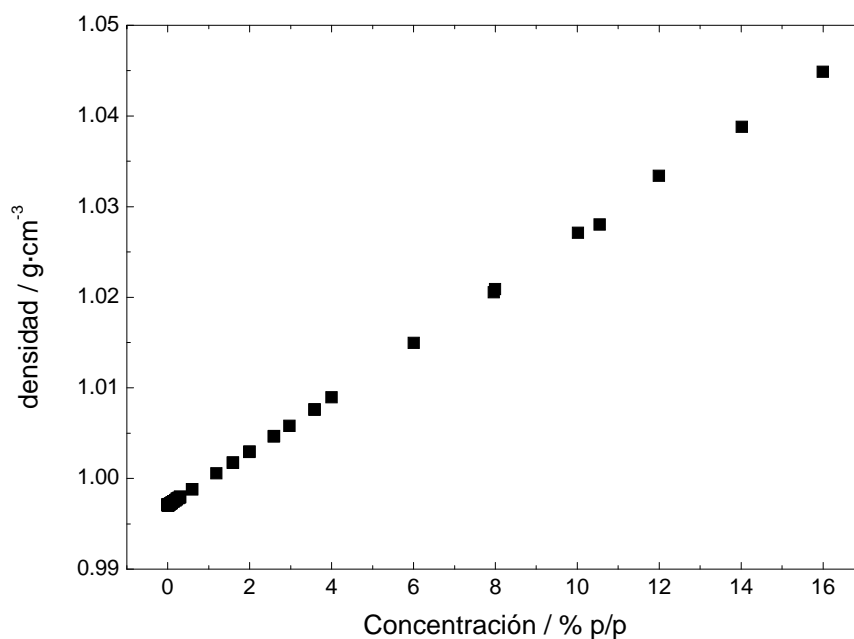
## **AIV.III Resultados**

### **AIV.III.I Medidas de densidad**

- **Variación con la concentración**

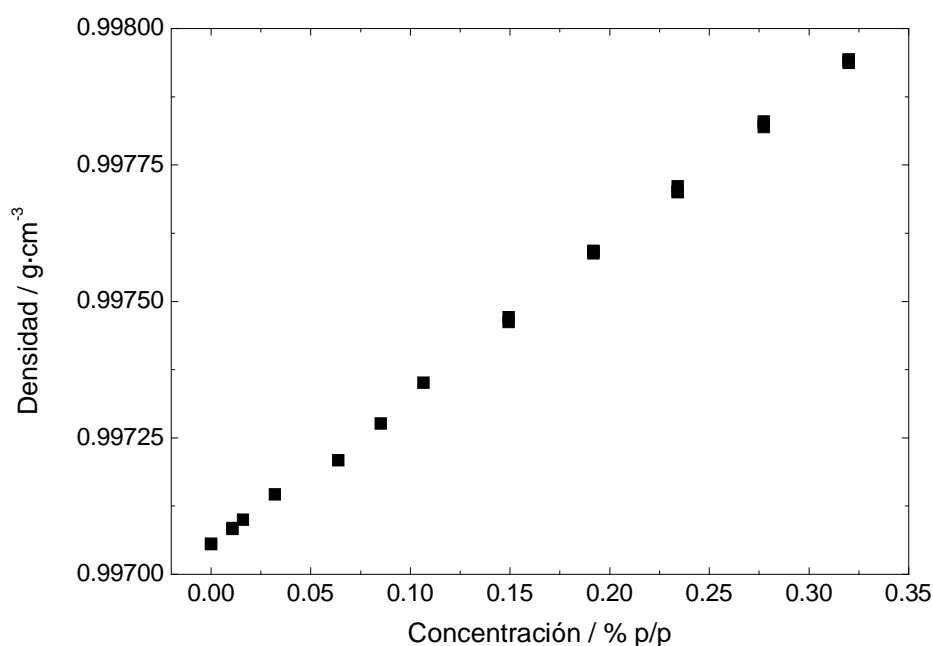
En la Figura AIV.I se muestra la variación de la densidad con la concentración a 298.15 K para todas las disoluciones de NaCas estudiadas.

Consultando la bibliografía se determinó el rango de concentración inicial de caseinato de sodio que debía ser objeto de estudio. Como se ha comentado, algunos autores<sup>4</sup> hablan de una CMC de la caseína  $\beta$  a temperatura ambiente entre 0.01 y 0.1 % p/p. Por ello se procedió a la preparación de disoluciones que cubrían el intervalo de concentración desde 0 a 0.3 % p/p de caseinato de sodio a 298.15 K. Las disoluciones se prepararon por triplicado, así como las medidas para comprobar la repetitividad, por lo que se realizaron nueve medidas para cada concentración. La repetitividad tanto entre medidas de una misma disolución como entre diferentes disoluciones de la misma concentración fue muy buena, con unas desviaciones estándar menores de  $0.0001 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  y  $0.0002 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  como máximo.



**Figura AIV.I.** Variación de la densidad con la concentración para el NaCas a 298.15 K.

Podemos ver en la figura cómo la variación con la concentración es lineal, a diferencia con lo que ocurre en el caso del NaL, donde se aprecia cierta curvatura (véase la Figura AIII.I) a partir de cierta concentración que corresponde a la CMC. En la ampliación de la zona de baja concentración, en la Figura AIV.II, se puede ver cómo no hay cambio de curvatura en esta región, como proponen algunos autores. Como ya se discutió en el Capítulo 6, el NaCas no sigue un proceso de agregación clásico en el que hay una CMC si no que es un proceso de agregación progresivo.

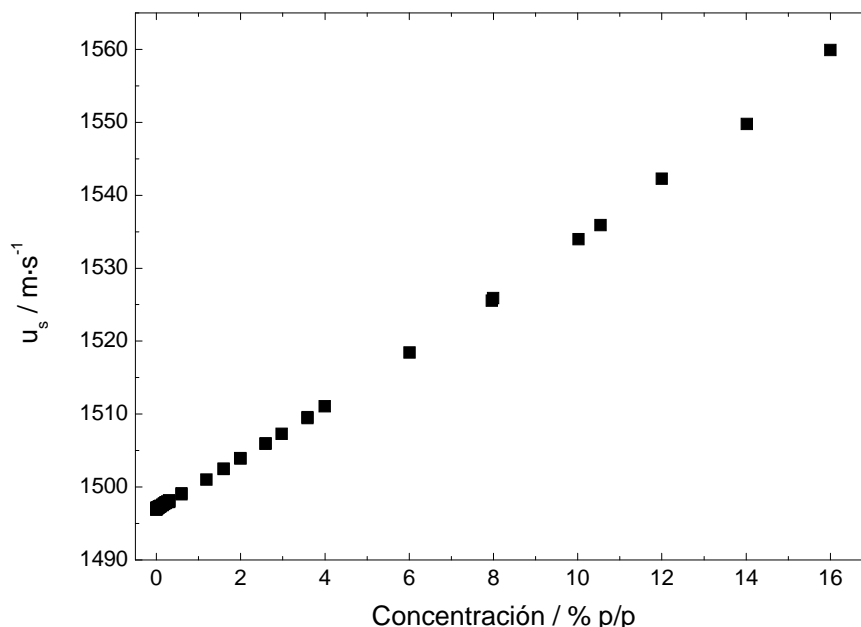


**Figura AIV.II.** Ampliación de la región de bajas concentraciones de la variación de la densidad con la concentración para el NaCas a 298.15 K.

**AIV.III.II Empleo de las medidas de densidad y velocidad del sonido**

- **Determinación de la compresibilidad adiabática en función de la concentración**

En el Capítulo 6 se discutieron las medidas de velocidad del sonido para el NaCas. A continuación en la Figura AIV.III se representa la variación de la velocidad del sonido con la concentración para el NaCas a 298.15 K.



**Figura AIV.III.** Variación de la velocidad del sonido con la concentración para el NaCas a 298.15 K.

En este Apéndice IV se combinan con las de densidad para la determinación de la compresibilidad adiabática,  $\kappa_s$ . Como se vio en el Apéndice III, en el caso del NaL se aprecia un cambio de curvatura con la concentración que indica claramente el valor de CMC. En la Figura AIV.IV se representa la variación de  $\kappa_s$  con la concentración para el NaCas a 298.15 K y no se observa un cambio de pendiente como en el caso del NaL, por lo que no podemos determinar la CMC. Esto es una evidencia más que el proceso de agregación en el NaCas no es clásico como en el NaL.

En la Figura AIV.IV se muestra la variación de la compresibilidad adiabática con la concentración. A concentraciones bajas, hay gran cantidad de monómeros libres, por lo que el valor de la compresibilidad adiabática es alto, pero a medida que aumenta la concentración, se forman los agregados micelares, quedando menos espacio entre ellos, y siendo, por tanto, más difícil de comprimir la muestra, por lo que la compresibilidad adiabática es menor.

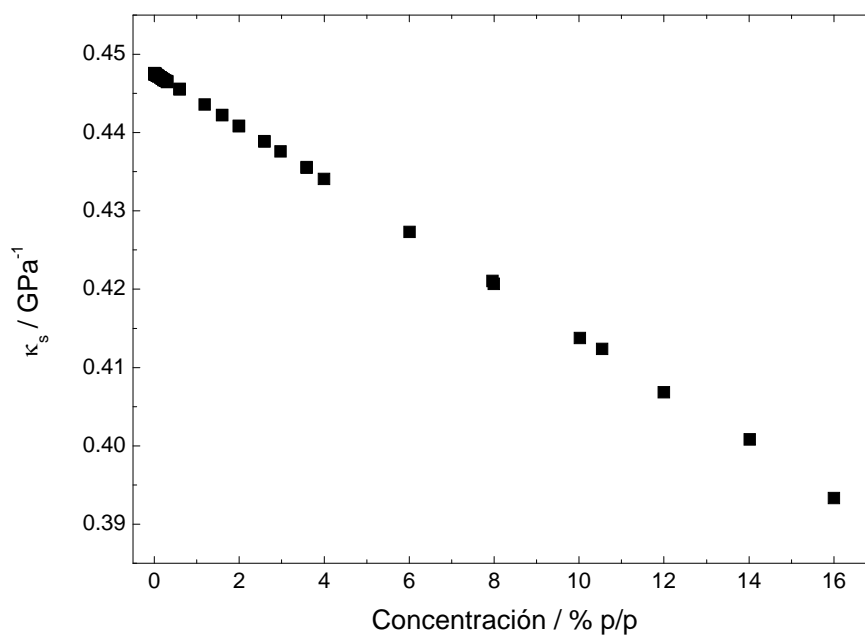


Figura AIV.IV. Variación de la compresibilidad adiabática con la concentración para el NaCas a 298.15 K.

#### AIV.IV Referencias

- <sup>1</sup> Farrel H. M., Kumosinski T. F., King G.; *Molecular Modelling. Am. Chem. Soc. Symp.* **1994**, 392-419.
- <sup>2</sup> Moschakis M., Murray B. S., Dickinson E.; *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 345, 278-285.
- <sup>3</sup> Hadjsadok A., Pitkowski A., Nicolai T., Benyahia L., Moulai M. N.; *Food Hydrocolloids.* **2008**, 22, 1460-1466.
- <sup>4</sup> Portnaya I., Cogan U., Livney Y. D., Ramon O., Shimon K., Rosenberg M., Danino D.; *J. of Agricultural and Food Chem.* **2006**, 54, 5555-5561.



## ***APÉNDICE V***

# ***DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA: FUNDAMENTOS Y APLICACIÓN AL CASEINATO DE SODIO***

---

### **AV.I Fundamentos de la dispersión de luz dinámica**

La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica óptica ampliamente utilizada para medir tamaño promedio de coloides poliméricos con partículas de tamaño submicrométrico. En este tipo de experimentos se hace incidir un haz de luz sobre una muestra de modo que el campo eléctrico de la luz induce una polarización oscilante sobre los electrones de la molécula. Así, las moléculas actúan como una fuente de luz secundaria y consecuentemente se dispersa la luz. El desplazamiento de la luz dispersada, distribución angular, polarización e intensidad de la misma vienen determinadas por el tamaño, forma e interacciones moleculares del material dispersante.<sup>1</sup> De este modo, de las características de la luz dispersada por un sistema es posible, con la ayuda de la electrodinámica y la mecánica estadística, obtener información de la estructura y la dinámica molecular del medio dispersante.

Básicamente, la instrumentación utilizada consiste en una fuente de luz láser monocromática que incide sobre una disolución muy diluida de la muestra a analizar, un fotómetro posicionado a un ángulo dado de detección,  $\theta_r$ , medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra y que recoge la luz dispersada por las partículas, y por último, un correlador digital que, junto con un software específico, permiten obtener la función de correlación de primer orden de la intensidad de luz dispersada a cada ángulo,  $g_{\theta_r}(\tau)$ , para diferentes valores del tiempo de retardo,  $\tau$ . La dispersión de tamaños promedio se obtiene por inversión numérica del modelo matemático que describe el fenómeno de dispersión de luz, dado por la teoría de Mie.<sup>1</sup>

Para cada ángulo  $\theta_r$  ( $r = 1, 2, \dots, R$ ), el modelo utilizado puede describirse mediante la siguiente ecuación integral de Fredholm de primera especie:

$$g_{\theta_r}(r) = \int_0^\infty e^{-\frac{\Gamma_0(\theta_r)}{D} \cdot \tau} \cdot C_1(\theta_r, D) \cdot f(D) \cdot dD \quad \text{Ecuación AV.I}$$

donde  $f(D)$  es la distribución de tamaños desconocida, representada como la densidad en número de partículas de diámetro  $D$ ;  $C_1(\theta_r, D)$  es la intensidad de luz dispersada por una partícula de diámetro  $D$  a un ángulo  $\theta_r$ , según la teoría de dispersión de luz de Mie; y  $\Gamma_0(\theta_r)$  depende de las condiciones experimentales, de acuerdo con:

$$\Gamma_0(\theta_r) = \frac{16\pi}{3} \cdot \left(\frac{n_m}{\lambda}\right)^2 \cdot \frac{k_B T}{\eta} \cdot \text{sen}^2\left(\frac{\theta_r}{2}\right) \quad \text{Ecuación AV.II}$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda en el vacío de la luz láser incidente;  $n_m$  es el índice de refracción del medio no absorbente;  $k_B$  es la constante de Boltzmann;  $T$  es la temperatura; y  $\eta$  es la viscosidad del medio (normalmente agua) a la temperatura  $T$ .

En general, el problema consiste en encontrar  $f(D)$  mediante inversión numérica de la Ecuación AV.I, que origina un problema inverso mal condicionado; es decir, pequeños errores en las mediciones pueden originar enormes cambios en la  $f(D)$  estimada. Para reducir la dimensión del problema inverso mal condicionado, se puede reemplazar la Ecuación AV.I por otra expresión representativa de diferentes diámetros medios de la distribución del tamaño de partícula, calculados a partir de las medidas DLS a cada  $\theta_r$ . Tales diámetros, a los cuales denominaremos  $D_{DLS}(\theta_r)$ , pueden ser evaluados con bastante precisión en la mayoría de los equipos comerciales de dispersión de luz, directamente a partir de las medidas, haciendo uso del método de los cumulantes.

Las medidas DLS se llevaron a cabo con un equipo CGS-8 de ALV GmbH (Langen, Alemania) en modo pseudo correlación cruzada, usando un láser de argón de longitud

de onda 514.5 nm (Coherent I300, California, EE.UU.) como fuente de excitación. La intensidad de las funciones de correlación se obtuvo a una temperatura fija de 298.15 K y en función del ángulo de dispersión,  $\theta$ , entre 30 y 150°, correspondiente a los vectores de onda,  $q$ , con valores comprendidos entre  $8.42 \cdot 10^4$  y  $3.14 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$ , donde  $q$  se define como:  $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$ , donde  $n$  representa el índice de refracción de la disolución.

Las funciones de correlación normalizadas de segundo orden,  $g^{(2)}(t)$ , se analizaron utilizando GENDIST<sup>2</sup> y CONTIN,<sup>3,4</sup> y en ambos casos se obtuvieron tiempos de relajación similares. La solución elegida fue la más probable y que estaba de acuerdo con el parámetro de regularización  $\alpha=0.5$ . A partir de los tiempos de relajación,  $\tau$ , se obtuvieron los coeficientes de difusión aparente,  $D^{app}$ , y utilizando la relación de Stokes-Einstein, se calcularon los radios hidrodinámicos aparentes ( $R_H^{app}$ ).<sup>5</sup>

$$\frac{1}{\tau} = D^{app} q^2 = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H^{app}} q^2 \quad \text{Ecuación AV.II}$$

Los experimentos se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo de 5 mm x 2 mm. Cada resultado experimental es el valor medio de diez experimentos y se considera la desviación estándar de esas medidas como el error experimental.

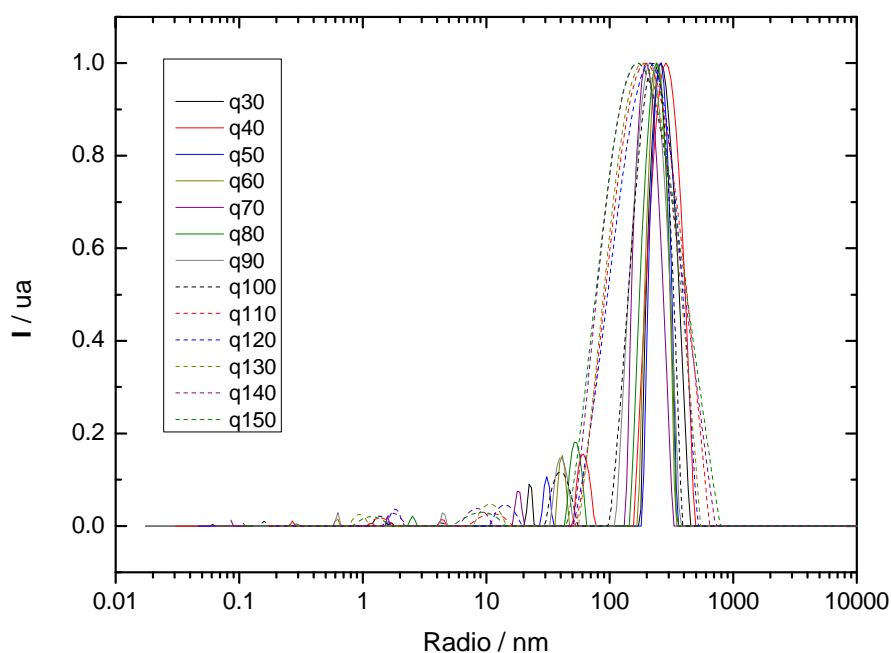
## AV.II Medidas de dispersión de luz en caseinato de sodio

### AV.II.I Medidas en una muestra sin tratar a alta presión

En el caso de la muestra de la disolución de caseinato de sodio 2.6 % p/p a presión atmosférica, el objetivo de las medidas consistió en determinar si para esa concentración, que es la misma que tiene la leche, el caseinato de sodio se encuentra agregado, y en tal caso, cuál es el tamaño de dichos agregados.

La muestra se preparó y fue medida al día siguiente para asegurar que se encontraba completamente disuelta. El análisis de la disolución indica que se trata de una muestra polidispersa con un radio comprendido entre 150 y 350 nm. Como se observa en la Figura AV.I, el 98 % de la disolución tiene este tamaño promedio y se observa una pequeña señal con una población de apenas el 2 % que podría corresponder a estructuras micelares. Resulta difícil asegurar que una señal con tan poca intensidad corresponde a las micelas.





**Figura AV.I.** Representación de la intensidad para cada ángulo en función del radio hidrodinámico.

En la Figura 6.16 se observa la distribución de tamaños para la muestra de caseinato de sodio del 2.6 % p/p. El tamaño promedio para todos los ángulos desde 30 a 150 ° es aproximadamente el mismo y comprendido entre 150 y 350 nm.

Además, también se ha estudiado la estabilidad del caseinato de sodio con el tiempo. Se preparó una disolución de caseinato de sodio al 2.6 % p/p y se midió al día siguiente de su preparación, como se hizo también para los experimentos de cambio de volumen como de ultrasonidos, y al cabo de 14 días para estudiar la estabilidad de la muestra con el tiempo. El objetivo del estudio de la muestra tras 14 días era comprobar si el proceso de agregación está afectado por el tiempo, es decir, si existe un factor cinético que favorece la formación de agregados.

Los resultados de este experimento muestran que la agregación no está afectada por el tiempo y que la disolución de caseinato de sodio del 2.6 % p/p es muy estable, puesto que se obtuvo una distribución de tamaños igual a la de la Figura 6.16, medida a las 24 horas de ser preparada.

#### **AV.II.II Medidas tras un tratamiento a alta presión**

El segundo experimento de análisis mediante dispersión de luz consistió en someter una muestra de caseinato de sodio 2.6 % p/p a una presión de 500 MPa durante 20 minutos. El objetivo de este experimento residía en comprobar si la presión favorece el proceso de agregación.

### AV.III Referencias

- <sup>1</sup> Berne B. J.; Pecora R. *John Wiley & Sons, Inc.* **1976**.
- <sup>2</sup> Jakes J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1995**, 60, 1781-1797.
- <sup>3</sup> Provencher S. W. *Comput. Phys. Comm.* **1982**, 27, 213-227.
- <sup>4</sup> Provencher S. W. *Comput. Phys. Comm.* **1982**, 27, 229-242.
- <sup>5</sup> *Handbook of Chemistry and Physics*, 60<sup>th</sup> ed. **1980**, CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.



## ABSTRACT OF THE Ph. D. THESIS

### Introduction

Understanding the behavior of water is often the key for answering many scientific and technical questions in a variety of both applied and fundamental research areas. Here we focus on the role of water in high pressure association phenomena on aqueous systems, more specifically on aqueous supramolecular aggregates and its technical relevance for food preservation. Historically, food preservation has represented a major challenge to the survival of societies. In order to store food for long periods, drying, salting or freezing have been traditionally used. More sophisticated preservation methods have been developed over the centuries. If initially the main goal was to preserve as much food as possible, nowadays, it is also to reach the highest quality standards at production and to maintain it during storage.

Thermal methods extend food shelf-life but are accompanied in a greater or lesser extent by changes in the organoleptic characteristics of food and a loss of nutritional quality. Among the newest preservation technologies, hydrostatic pressure processes are emerging as an alternative or complement to conventional heat treatments (pasteurization, cooking, sterilization, etc.) since it keeps better food organoleptic and nutritional qualities.

One of the most popular foods in the world and with many beneficial nutritional properties for health is milk. By substituting heat by pressure, these interesting healthy properties could be saved. In fact, milk was one of the first foods subject to high pressure processing. Besides, the influence of pressure on milk proteins, and especially casein micelles, allows for modulating texture of dairy products. The size of casein aggregates greatly defines the texture of dairy products or of those containing caseins as an additive in the form of caseinate. Thus the control of the characteristics of casein aggregates by pressure is of utmost importance.

In this Ph. D. Thesis, we address the issue of changes in the state of aggregation of proteins under pressure. In contrast to previous researches related to this issue, we propose to give prominence to water. Water is a simple molecule formed just by three atoms, but it is considered as essential in something so complicated as the origin of life. For this reason, scientific community hardly studies its behavior and its interaction with other molecules in solution.

Other scientific research purpose during last decades has been to know the matter behavior under pressure. Knowing what happen to a solid, water or a protein

under pressure can help us to understand many physicochemical phenomena and to open new possibilities in science and food technology. Therefore, one of the main goals that we have proposed in this Ph. D. Thesis has been to combine the effect of pressure with the study of water, since it is a hot topic in science and it is also a challenge with promising results.

One of the more interesting subjects about studying water under pressure is the discovery of two different phases in liquid water, low density water, LDW, and high density water, HDW. One motivation of this Ph. D. Thesis was to study this phase transition by sound velocity measurements and how this change would affect to practical applications in food processing. High pressure is considered an alternative to the traditional thermic treatment for the long lasting properties. In fact, nowadays we can find some products at the supermarket that have been treated under high pressure. To be able to use this technology on food it is necessary to study each component separately.

In order to study caseins under pressure it is necessary to have a starting point, because caseins have a complex structure. Firstly, we have studied sodium dodecanoate, because it has a simpler structure than caseins but it has aggregation properties similar than them. Understanding the phenomena that take places in sodium dodecanoate can help us to understand the aggregation phenomena in caseins. Thus, in order to study the effect of pressure on the aggregation of the caseins is necessary to know firstly the behavior of sodium dodecanoate. Finally we will be able to evaluate the interaction between water and aggregates.

Therefore, the scheme that we have proposed in this Ph. D. Thesis is as follows: first to study the water behavior under pressure, then the sodium dodecanoate and finally the sodium caseinate and milk.

## Objectives

The first chapters deal with the introduction and the techniques used during the Ph. D. Thesis. The following chapters intend to study the role that water plays in the stability of aggregates under different conditions of concentration, temperature and pressure. We can summarize the main purposes of each chapter as follows:

- **Chapter 4: Study of water under pressure by ultrasound measurements**
  - To characterize the effect of pressure on the structure of liquid water using sound velocity measurements.

- We pretend to use the high precision of speed of sound measurements in water to study the transition between low density water (LDW) and high density water (HDW).
- **Chapter 5: Study of sodium dodecanoate under pressure by ultrasound measurements**
  - To determine the aggregation conditions (concentration, temperature, pressure) of a model system using speed-of-sound measurements.
  - The measurements of speed-of-sound under pressure in sodium dodecanoate aqueous solutions will help us to understand how the behavior of a micellar system under these conditions is. This will give us a starting point to study more complex systems.
- **Chapter 6: Study of aggregation phenomena in caseins**
  - To investigate the state of aggregation of a complex protein system by applying the experimental methodologies previously developed.
  - In order to study aggregation phenomena in caseins, we will carry out speed-of-sound experiments at room temperature, firstly, at atmospheric pressure as a function of concentration, and then, at high pressure (up to 700 MPa) for a selected concentration of sodium caseinate in aqueous solution. Furthermore, we will monitor by ultrasound measurements under pressure the changes in a sample of pasteurized skimmed milk.
- **Chapter 7: Study of hydration changes by apparent volumetric properties**
  - To evaluate the effect of pressure on the interaction between water and aggregates from the determination of the behavior of the apparent properties for each of the previous substances (sodium dodecanoate and sodium caseinate).
  - The use of apparent volumetric properties will help us to understand how the interaction between supramolecular aggregate and water is modified under different conditions (concentration, temperature, pressure). In order to achieve this goal, we will carry out ultrasound and volumetric measurements at atmospheric pressure as a function of concentration and temperature, as well as at high pressure for a selected concentration for each substance.

## Materials and methods

The substances studied in this Ph. D. Thesis were ultrapure water, sodium dodecanoate, sodium caseinate and pasteurized skimmed milk. Density and speed-of-sound measurements were carried out at atmospheric pressure with an Anton Paar DSA 5000M equipment. At high pressure, the speed-of-sound was measured with the multi-reflections technique and the density was derived from volume change measurements. Both techniques employed prototype cells that were designed in collaboration and manufactured at Unipress (Institute of High Pressure Physics, Poland).

## Results

The results achieved in this Ph. D. Thesis contribute to a better understanding of the aggregation phenomena not only at atmospheric pressure but also at high pressure. We can enumerate the main results for each substance.

- **Water**

We have measured the speed-of-sound in water in a wide range of temperatures and with a high accuracy.<sup>1</sup> We have provided data at pressures and temperatures conditions or in a region of the water phase diagram where there was a lack of them or where their uncertainty was higher than desirable. Then, from these data, we were able to determine the pressure – temperature conditions where the transition takes place between the low density water (LDW) and the high density water (HDW). We could observe a change in the slope of the time-of-flight derivative with pressure which we linked to the transition in liquid water structure. There are some works in the literature about LDW → HDW transition with different techniques, but limited to only few temperatures.<sup>2,3,4</sup> From the eleven temperatures studied here, the LDW → HDW transition region was established with a high accuracy between 250 and 350 K.

- **Sodium dodecanoate**

Speed-of-sound measurements in sodium dodecanoate aqueous solutions allowed us for obtaining information about the behavior of micellar system under pressures up to 700 MPa. The investigated pressure interval was enlarged compared to the previous similar works. In a micellar system, when we plot a property as a function of concentration, a change of slope occurs at a certain concentration; this is named critical micelle concentration, CMC. We have observed how CMC changes with temperature at atmospheric pressure

and with pressure at 298.15 K. The CMC exhibited a minimum with temperature at about 313.15 K and a maximum with pressure around 200 MPa. At pressures higher than 300 MPa, the phenomenon of micelles formation disappeared and a new phase characterized by a higher sound attenuation was found.

- **Caseins**

The experiments carried out at atmospheric pressure showed that the aggregation mechanism is different from that of sodium dodecanoate in water. No CMC as for sodium dodecanoate could be defined from density and ultrasound measurements. The aggregation mechanism was rather stepwise, taking place over a wide range of concentration, unlike for sodium dodecanoate case. At high pressure, speed-of-sound in sodium caseinate solutions and in pasteurized skimmed milk increased in a similar way to water with pressure. We noticed the same change of slope in the derivative of speed-of-sound with pressure as for water indicating that the LDW  $\rightarrow$  HDW transition still happened in spite of solutes presence.

- **Water-aggregates interactions**

Density and speed-of-sound were measured in water and in aqueous solutions of sodium dodecanoate or sodium caseinate at atmospheric pressure between 273 and 333 K. Measurements were also performed at high pressure for water and for each solution at one selected concentration. From these measurements, the apparent volumetric properties, namely the apparent molar/specific volume and the apparent adiabatic compressibility, were calculated. At atmospheric pressure, we found a good agreement with published values. Moreover, we remarked that the behavior of the apparent volumetric properties with temperature shares some feature with water properties anomalies. At high pressure, since this type of data is almost inexistent in the literature, no checking was possible. Nonetheless, the behavior of the apparent specific/molar volume was consistent with that of the apparent adiabatic compressibility taking into account the particularities of each studied substance. The apparent specific/molar volume globally decreased with pressure for both substances. The apparent adiabatic compressibility, after an initial increase, remained almost constant with pressure from 400 MPa for sodium dodecanoate and from 260 MPa for sodium caseinate.



## Conclusions

The overall aim of this Ph. D. Thesis was to elucidating the role that water can play in the formation and stability of supramolecular aggregates in an aqueous environment. Since the specific objectives have been included at the end of Chapters 4 to 7, here our aim is trying to provide a global discussion of our results based on these conclusions, referring the reader to the end of each chapter for more specific conclusions and details. We believe that this is the appropriate way to respond to the question implicit in the title of this Ph. D. Thesis that is to determine whether the changes observed in aqueous supramolecular systems can be attributed to the so-called water anomalies appearing across the P-T phase diagram of water.

The results of Chapter 4 support the methodology and experimental techniques chosen in this work, since we have been able to define with precision the LDW-HDW structural transition (low-density water to high-density water). We also describe how we have found systematic deviations with respect to the IAPWS-95 equation, which is used as a reference word-wide. More specifically, the results provided in this Ph. D. Thesis correspond to the most important region of the phase diagram of water for food preservation of food, *i.e.* in the vicinity of the liquid-ice VI and water-ice Ih phase transitions. Additionally, our results indicate that the phase transitions water-ice III and water-ice V, appearing in the same region of the P-T phase diagram cannot be as well defined as other authors stated. We believe that the difficulty in carrying out accurate measurements in these conditions of pressure and temperature, possibly due to kinetic phenomena and their sensitivity to the presence of impurities, determines the absence of accurate measurements for defining precisely the equilibrium lines in this region of the phase diagram.

Perhaps the most characteristic and well-known property in supramolecular aggregation phenomena is the critical micelle concentration (CMC), that we discussed in Chapter 5 with the analysis of a model system, the NaL. This analysis allowed us to validate our methodology for determining the CMC as a function of temperature at atmospheric pressure using sound velocity measurements. Later this methodology was used study how the CMC varies with temperature from 283.15 to 333.15 K. These series of measurements were needed to address the study of apparent properties in Chapter 7. But perhaps the most relevant and novel results provided in this work refers to the pressure dependence of the CMC of NaL at room temperature. Our measurements agree, within the estimated uncertainty, with previous results from the literature, thus validating our methodology. However, at higher pressures we have

found a new denser phase that we named hydrated solid phase, according to the accepted name found for other surfactants. The methodology devised in this Ph. D. Thesis to determine these state changes must be also discussed. On one hand, very high precision speed of sound results were required, since the values found in solution hardly differ from those observed in pure liquid water at the same temperature and pressure conditions. And secondly, it has been necessary to carry out a comprehensive and intensive numerical analysis of these results, since the transitions detected are defined by subtle changes in the derivative of the speed of sound as a function of pressure. We can conclude then that, while the speed of sound is a property sensitive to changes caused by the formation of supramolecular phases within the solution, its application requires high precision techniques, such as those used in this work, and the reproducibility must be confirmed by a large number of independent measurements.

In Chapter 6, we have studied NaCas, a reference compound for milk caseins, and real casein obtained from pasteurized skim milk (LDP). These systems have no CMC defined values, as occurred in the case of NaI, but the first derivative of the sound velocity also change its slope around a pressure of 300 MPa. The fact that this slope change occurs in the same pressure range as the LDW-HDW transition suggests that the observed changes in solution should not be attributed to the aggregation process, which we have shown that it is progressive, but the structural changes of water. This is perhaps one of the most important findings of our work, since possible structural changes already described in the literature for casein aggregates and similar proteins have been discussed in the light of changes observed in measures of speed of sound or other properties.

The above discussion justifies the detailed analysis of the properties dedicated apparent to Chapter 7 of this Ph. D. Thesis, in which we also confirmed that the behavior of the apparent volumetric properties with temperature shares some feature with water properties anomalies. This conclusion is within the general scope covered in this this Ph. D. thesis and we hope that will serve as a guide for future studies of aqueous systems from both fundamental and applied points of view.

## References

- <sup>1</sup> Hidalgo Baltasar E., Taravillo M., García Baonza V., Sanz P. D., Guignon B.; *J. Chem. Eng. Data.* **2011**, 56, 4800-4807.
- <sup>2</sup> Saitta A. M., Datchi F.; *Phys. Rev. E.*, **2003**, 67, 020201(R).
- <sup>3</sup> Li F., Cui Q., He Z., Cui T., Zhang J., Zhou Q., Zou G.; *J. Chem. Phys.*, **2005**, 123, 174511.
- <sup>4</sup> Kawamoto T., Ochiai S., Kagi H.; *J. Chem. Phys.*, **2004**, 120, 5867.